

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-501137

(43) 公表日 平成10年(1998) 2月3日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 7/13		9550-4C	A 6 1 K 7/13	
C 1 2 N 1/15		9735-4B	C 1 2 N 1/15	
		9359-4B		9/02
D 2 1 C 9/10		7633-3B	D 2 1 C 9/10	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-501132  
(86) (22) 出願日 平成7年(1995) 5月31日  
(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996) 12月3日  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 5 / 0 6 8 1 5  
(87) 国際公開番号 W O 9 5 / 3 3 8 3 6  
(87) 国際公開日 平成7年(1995) 12月14日  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 2 5 3 , 7 8 1  
(32) 優先日 1994年6月3日  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 4 4 1 , 1 4 6  
(32) 優先日 1995年5月15日  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク バイオテック, イン  
コーポレイティド  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616  
-4880, デービス, ドリュウ アベニュー  
1445  
(71) 出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ  
プ  
デンマーク国, デーコー-2880 バグスバ  
エルト, ノボ アレ (番地なし)  
(72) 発明者 バーカ, ランディ エム.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616,  
デービス, モドック ブレイス 3609  
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精製されたマイセリオフトラ・ラッカーゼ及びそれをコードする核酸

(57) 【要約】

本発明はマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする配  
列を含む単離された核酸構築体及びそれによりコードさ  
れるラッカーゼタンパク質。

**【特許請求の範囲】**

1. マイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする配列を含むDNA 構築体。
2. マイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼをコードする配列を含んで成る、請求項1記載の構築体。
3. SEQ ID NO. 2に示すアミノ酸配列をコードする核酸配列を含んで成る、請求項1記載の構築体。
4. SEQ ID NO. 1に示す核酸配列を含んで成る、請求項1記載の構築体。
5. NRRL B-21261 に含まれている核酸配列を含んで成る、請求項1記載の構築体。
6. 実質的に純粋なマイセリオフトラ・ラッカーゼ酵素。
7. マイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼである、請求項6記載の酵素。
8. SEQ ID NO. 2に示すアミノ酸配列、又はそれに対して約80%以上の相同性を有する配列を含んで成る、請求項6記載の酵素。
9. マイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする配列を含むDNA 構築体を含んで成る組換えベクター。
10. 前記構築体がプロモーター配列に作用可能式に連結されている、請求項9記載のベクター。
11. 前記プロモーターが菌類又は酵母プロモーターである、請求項10記載のベクター。
12. 前記プロモーターがアスペルギルス・オリザのTAKAアミラーゼプロモーターである、請求項11記載のベクター。
13. 前記プロモーターがアスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・アワモリのグルコアミラーゼ (gluA) プロモーターである、請求項11記載のベクター。
14. 選択マーカーも含んで成る、請求項9記載のベクター。
15. 前記選択マーカーがamds, pyrG, argB, hiaD, sC及びhygGより成る群から選ばれる、請求項14記載のベクター。

16. 前記選択マーカーがアスペルギルス・ニドゥランスもしくはアスペルギルス・オリザのamdSマーカー、又はアスペルギルス・ニドゥランス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリもしくはアスペルギルス・オリザのpyrGマーカーである、請求項14記載のベクター。

17. アスペルギルス・オリザのTAKAアミラーゼプロモーター及びアスペルギルス・ニドゥランス又はアスペルギルス・オリザのamdS又はpyrGマーカーの双方を含んで成る、請求項14記載のベクター。

18. マイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸配列を含む異種核酸構築体を含んで成る組換宿主細胞。

19. 菌類細胞である請求項18記載の細胞。

20. アスペルギルス細胞である請求項19記載の細胞。

21. 前記構築体が宿主細胞のゲノムの中に組み込まれている、請求項18記載の細胞。

22. 前記構築体がベクター上に含まれている、請求項18記載の細胞。

23. SEQ ID NO. 2に示されているアミノ酸配列をコードする配列を含む構築体を含んで成る、請求項18記載の細胞。

24. マイセリオフトラ・ラッカーゼ酵素をコードする核酸配列を含むDNA 構築体を含んで成る組換宿主細胞を該酵素の発現を誘導する条件下で培養し、次いでその培養物から該酵素を回収することを含んで成る、ラッカーゼ酵素を獲得するための方法。

25. 請求項24の方法により得られるマイセリオフトラ酵素。

26. 至適pHにおいてシリungalダジンに対して30SOU/mg以上の比活性を有する子囊菌綱又は不完全菌類。

27. 銅含有酵素をコードする配列を含むDNA 構築体を含んで成る組換宿主細胞を該酵素の発現を誘導する条件下で、約0.02mM以上の銅の存在下で培養することを含んで成る、活性組換銅含有酵素の収量を高める方法。

28. リグニン又はリグノスルフェート基質を溶液重合するための方法であって、前記基質をマイセリオフトラ・ラッカーゼと接触させることを含んで成る方法

。

29. クラフトパルプにおけるin situ 脱重合のための方法であって、前記パルプをマイセリオフトラ・ラッカーゼと接触させることを含んで成る方法。

30. 染料又は染料前駆体を酸化するための方法であって、前記染料をマイセリオフトラ・ラッカーゼと接触させることを含んで成る方法。

31. 毛髪を染色するための方法であって、マイセリオフトラ・ラッカーゼを、少なくとも一種の改質剤の存在下又は非存在下で、少なくとも一種の染料前駆体と、その染料前駆体が染料へと酸化するのに足りる時間及び条件下で接触させることを含んで成る、方法。

32. 前記染料前駆体がジアミン、アミノフェノール及びフェノールより成る群から選ばれる、請求項31記載の方法。

33. 前記改質剤が、使用する場合、メタージアミン、メターアミノフェノール又はポリフェノールである、請求項31記載の方法。

34. 前記染料前駆体がオルトもしくはパラジアミン又はアミノフェノールより成る群から選ばれる一次中間体である、請求項32記載の方法。

35. 一種より多くの染料前駆体を使用する、請求項31記載の方法

。

36. 一種より多くの改質剤を使用する、請求項31記載の方法。

37. 一次中間体及び改質剤の双方を使用する、請求項31記載の方法。

38. 少なくとも一種の染料前駆体と組合されたマイセリオフトラ・ラッカーゼを含んで成る染料組成物。

39. 少なくとも一種の一次中間体及び少なくとも一種の改質剤と組合された、マイセリオフトラ・ラッカーゼを含んで成る染料組成物。

40. マイセリオフトラ・ラッカーゼ及び少なくとも一種の染料前駆体を無酸素雰囲気下で含んで成る染料組成物を含む容器。

41. 少なくとも一種の改質剤と組合された少なくとも一種の一次中間染料前駆体を含む請求項40記載の容器。

42. フェノール系又はアニリン化合物を重合又は酸化するための方法であって

、フェノール系又はアニリン化合物をマイセリオフトラ・ラッカーゼと接触させることを含んで成る方法。

**【発明の詳細な説明】**

精製されたマイセリオフトラ・ラッカーゼ及びそれをコードする核酸

**発明の分野**

本発明は菌類オキシドリダクターゼ酵素をコードする単離された核酸酵素フラグメント及びそれにより産生された精製酵素に関する。より詳しくは、本発明はフェノールオキシダーゼ、特に好熱性子囊菌綱マイセリオフトラ (*Myceliophthora*) のラッカーゼをコードする核酸フラグメントに関する。

**発明の背景**

ラッカーゼ (ベンゼンジオール：酸素オキシドリダクターゼ) は多銅含有酵素であり、フェノール類の酸化を触媒する。ラッカーゼ媒介式酸化は適当なフェノール系基質からのアリールオキシ基中間体の産生をもたらす。このようにして産生された中間体の究極的なカップリングは二量体、オリゴマー及び重合反応産物の組合せを供する。かかる反応はメラニン、アルカロイド、毒素、リグニン及びフミン酸 (humic acid) の形成をもたらす生合成経路において本質的に重要である。ラッカーゼは多種多様な菌類、例えば子囊菌綱、例えばアスペルギルス (*Aspergillus*)、ニューロスポラ (*Neurospora*) 及びポドスポラ (*Podospora*)、不完全菌類ボツリチス (*Botrytis*)、並びに担子菌綱、例えばコリビア (*Collybia*)、ホームズ (*Fomes*)、レンチヌス (*Lentinus*)、プレウロトウス (*Pleurotus*)、トラメテス (*Trametes*)、及びリゾコトニア (*Rhizoctonia*) の完全形態により産生される。ラッカーゼは幅広い基質特異性を示し、そ

して各種の菌類ラッカーゼは通常フェノール系基質を酸化するその能力において互いと力価的に相違する。基質多様性を理由に、ラッカーゼには一緒に多くの潜在的な産業用途が見い出されている。それはとりわけリグニンの修飾、紙の強化、洗剤における染料転移の阻害、フェノールの重合、ジュースの製造、フェノール樹脂の製造及び廃水処理である。

種々の菌類種により作られるラッカーゼの触媒能力は類似しているか、異なる至適温度及びpHを有し、そしてこれらは特定の基質に依存しても相違しうる。数多くのこれらの菌類ラッカーゼが単離されており、そしてこれらのいくつかにつ

いての遺伝子がクローニングされている。例えば、Choiら(Mol. Plant-Microbe Interactions 5: 119-128, 1992)には、チェストナッツ・ブライト (chestnut blight) 菌類クリホネクトリア・パラシチカ (*Cryphonectria parasitica*) のラッカーゼをコードする遺伝子の分子特性決定及びクローニングが記載されている。Kojimaら (J. Biol. Chem. 265: 15224-15230, 1990; JP2-23885) はホワイト・ロット (white-rot) 担子菌綱コリオルス・ハーストウス (*Coriolus hirsutus*) のラッカーゼの2通りの対立形質の説明を供する。Germann and Lerch (*Experientia* 41: 801, 1985; PNAS USA 83: 8854-8858, 1986) はニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) ラッカーゼ遺伝子のクローニング及び部分配列決定を報告する。Saloheimo ら (J. Gen. Microbiol. 137: 1537-1544, 1985; W092/014046) は菌類フレビア・ラジアタ (*Phlebia radiata*) 由来のラッカーゼ遺伝子の構造分析を開示する。

異種菌類系においてラッカーゼ遺伝子を発現させる試みは往々にして非常に低い収量をもたらす (Kojimaら、前掲; Saloheimo ら、Bio/Technol. 9: 987-990, 1991)。例えば、トリコデルマ・リーゼ

イ (*Trichoderma reesei*) におけるフレビア・ラジアタラッカーゼの異種発現は1リットル当り20mgの活性酵素しか供していない (Saloheimo, 1991、前掲)。ラッカーゼは偉大な商業的潜在性を有するが、大量に酵素を発現する能力はその商業的用途にとって重要である。現時点では、商業的に利用されている宿主、例えばアスペルギルスにおいて高レベルで発現されるようなラッカーゼはない。即ち、商業的に有用な (即ちグラム/リットル又はそれより多くの) 量で産生されるラッカーゼの存在のニーズがある。本発明はかかるニーズに応える。

#### 発明の概要

本発明はマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸配列を含むDNA 構築体に関する。本発明は更に核酸配列によりコードされる単離されたラッカーゼにも関連する。好ましくは、ラッカーゼは実質的に純粋である。「実質的に純粋」とは、ラッカーゼがその他の非ラッカーゼタンパク質を本質的に含まないことを意味する (即ち $\geq 90\%$ )。

新規ラッカーゼの産生を助長するため、本発明は更に請求の範囲記載の核酸配列を含んで成るベクター及び宿主細胞も提供し、このベクター及び宿主細胞はラッカーゼの組換え生産において有用である。この配列は選定した宿主細胞におけるラッカーゼタンパク質の発現を指令することのできる転写及び翻訳シグナルに作用可能式に連結されている。好適な宿主細胞は菌類細胞であり、最も好ましいのはアスペルギルス属のそれである。本発明のラッカーゼの組換え生産は本発明の構築体により形質転換された又はトランスフェクションされた宿主細胞又はその子孫を、ラッカーゼタンパク質の発現に適する条件下で培養し、そしてその培養物からラッカーゼタンパク質

を回収することにより達成される。

本発明のラッカーゼはフェノール類の酸化を必要とする数多くの産業プロセスにおいて有用である。これらのプロセスにはリグニンの処理、ジュースの製造、フェノールの重合及びフェノール樹脂の製造が含まれる。

#### 図面の簡単な説明

図1はpRaMB1における7.5 EcoR I フラグメントの制限地図を示す。N. クラッサ・ラッカーゼ遺伝子プローブハイブリダイズする領域に陰影をつけた。

図2はマイセリオフトラ・サーモフィラ (*M. thermophila*) ラッカーゼのヌクレオチド (SEQ ID NO: 1) 及びアミノ酸 (SEQ ID NO: 2) を示す。ヌクレオチド配列における下方の小文字はイントロンの位置を示す。プロモーター領域の推定TATA及びCAAT配列を太文字で示し、そして下線を付した。イントロン内の共通ラリアット構築 (PuCTPuAC) に下線を付した。

図3はプラスミドpRaMB5の構築を示す。

#### 発明の詳細な説明

マイセリオフトラ・サーモフィラは最初にApinisにより論じられ (Nova Hedwigia 5: 57-78, 1963)、そしてスポロトリカム・サーモフィル (*Sporotrichum thermophile*) と称された好熱性子囊菌綱である。その後の分類学的修正はこの生物をクリソスポリウム属に属させ (Von Klopotek, A. Arch. Microbiol. 98: 365-369, 1974)、そしてその後マイセリオフトラに属させた (Van Oorschot, Pers



oonia 9: 401-408, 1977)。その他の名称で知られるいくつかの生物もこの種に属することが明らかとされた。それらにはスポロト

リカム・セルロフィルム (*S. cellulophilum*) (米国特許第4,106,989号) ; シーラビア・サーモフィラ (*Thielavia thermophila*) (Fergus and Sinden, Can. J. Botany 47: 1635-1637, 1968) ; クリソスポリウム・ファーガシ (*C. fergussi*) 及びコリナスカス・サーモフィルス (*Corynascus thermophilus*) (Von Klopotek, 前掲) が含まれる。この種はいくつかの種々の工業的に有用な酵素、例えばセルラーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ及びキシラナーゼの起源として知られる (例えば、Oberson ら、Enzyme Microb. Technol. 14: 303-312, 1992; Merchant ら、Biotechnol. Lett. 10: 513-516, 1988; Breuil ら、Biotechnol. Lett. 8: 673-676, 1986; Gilbert ら、Bioresource Technol. 39: 147-154, 1992を参照のこと)。マイセリオフトラは中性pHのラッカーゼを産生し、そしてこのラッカーゼをコードする遺伝子は慣用の宿主系、例えばアスペルギルスを大量に生産するために利用できることがこの度決定された。

マイセリオフトラにおけるラッカーゼ遺伝子の存在を同定するため、ニューロスポラ・クラッサ・ラッカーゼ遺伝子の5'領域(cc1)は、種々の菌類種の全ゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーションにおける温和なストンジェンシーの条件下でのプローブとして用いられる。約12kbのラッカーゼ特異性配列がマイセリオフトラDNAにおいて検出される。次いでN. クラッサフラグメントを $\lambda$ EMBL4バクテリオファージクローニングベクターの中の約20,000ブランクのM. サーモフィラ・ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングするために用いる。8ブランクがこのプローブと強くハイブリダイズする。この8つのうち、3つからDNAを単離した。これらのクローンをそれぞれは7.5 EcoRIフラグメントを含み、それもプローブにハイブリダイズする(図1)。フラグメントのうちの1つをpBR322の中にサブクローニングし、プラスミドpRaMB1を作り上げた。I

cc1プローブを用い、クローンのコード領域の位置を決定する。全M. サーモフィラコード領域は3.2KbのNheI-BglIIセグメントを含むことが明らかとなり

、それをpUC119にクローニングし、そしてプライマー歩行法により配列決定した。

配列が決定されたら、遺伝子内のイントロン及びエキソンの位置を、対応のN. クラッサ・ラッカーゼ遺伝子産物に対する推定アミノ酸配列の整合に基づき認定する。この対比から、M. サーモフィラの遺伝子(lccM)は6つのイントロン(85, 84, 102, 72, 147及び93ヌクレオチド)により介在された7つのエキソン(246, 79, 12, 70, 973, 69及び411ヌクレオチド)より成ることが明らかとなる。介在配列を除くコード領域は非常にGCリッチ(65.5%のG+C)であり、そして620 アミノ酸のプレプロ酵素: 22アミノ酸のシグナルペプチド、25アミノ酸のプロペプチド及び573個のアミノ酸を含んで成る成熟ラッカーゼをコードする。M. サーモフィラ遺伝子の配列及び推定アミノ酸配列を図2に示す(SEQ ID NO: 1及び2)。

次いでラッカーゼ遺伝子をアスペルギルス宿主細胞の形質転換のための発現ベクターを作り上げるために利用する。このベクターpRaMB5はA. オリザTAKA-アミラーゼプロモーター及びターミネーター領域を含む。pRaMB5の構築を図3に概略する。アスペルギルス細胞をこの発現ベクター及びpyrG又はamdS選択マーカーを含むプラスミドにより同時形質転換させる。形質転換体はABTSを含む適当な選択培地に基づいて選定する。ラッカーゼ産生コロニーは緑色の輪を示し、従って容易に単離できる。選定した形質転換体を振盪フラスコの中で増殖させ、そして培養培地をシリungalダジン(syringaldazine)法によりラッカーゼ活性について試験した。振盪フラスコ培養物は0.2 g/l以上のラッカーゼを産生でき、そして発酵槽の

中では1~2 g/lを超える収量が認められる。

本発明に従うと、ラッカーゼをコードするマイセリオフトラ遺伝子は上記の方法により、又は本明細書において提供する情報を利用して当業界公知の別の方法により得られうる。この遺伝子は発現ベクターを用い、活性形態で発現されうる。有用な発現ベクターは宿主細胞ゲノムへのベクターの安定な組込み又は宿主細胞のゲノムと独立した宿主細胞の中でのベクターの自己複製を可能とする因子、

及び好ましくは形質転換宿主細胞の容易な選定を可能とする1又は複数の表現型マーカーを含む。発現ベクターは更に、プロモーター、リボソーム結合性部位、翻訳開始シグナル、及び任意的にリプレッサー遺伝子又は様々な活性化性遺伝子をコードするコントロール配列を含みうる。発現されたタンパク質の分泌を可能とするため、シグナル配列をコードするヌクレオチドを遺伝子のコード配列の前に挿入してよい。コントロール配列の指令下での発現のため、本発明に従って利用されるラッカーゼ遺伝子は適当なリーディングフレーム内でコントロール配列に作用可能式に連結されている。プラスミドベクターの中に組込むことができ、そしてラッカーゼ遺伝子の転写を指令できうるプロモーター配列には、限定することなく、原核系 $\beta$ -ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroffら、1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75: 3727-3731)及びtac プロモーター(DeBoerら、1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80: 21-25)が含まれる。更なる参考は「Useful proteins from recombinant bacteria」Scientific American, 1980, 242: 74-94及びSambrookら、「Molecular Cloning」1989に見い出せうる。

本発明のDNA 構築体を担持する発現ベクターは、組換DNA 手順に簡単に委ねることのできる任意のベクターであってよく、そしてベクターの選定は一般にそれを導入する宿主細胞に依存するである

う。即ち、ベクターは自己複製式ベクター、即ち、染色体外資として存在し、その複製が染色体の複製とは独立したベクター、例えばプラスミド、又は染色体外因子、ミニクロモソームもしくは人工染色体でありうる。他方、このベクターは、宿主細胞の中に導入したとき、宿主細胞ゲノムの中に組込まれ、そしてその組込まれた染色体と一緒に複製するものでありうる。

ベクターの中では、ラッカーゼDNA 配列は適当なプロモーター配列に作用可能式に連結されているべきである。このプロモーターは選定の宿主細胞の中で転写活性を示す任意のDNA 配列であってよく、そして宿主細胞と同族又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子に由来しうる。本発明のDNA 構築体の転写を指令するのに適当なプロモーター、特に細菌宿主におけるプロモーターの例は、E. コリ(E. coli)のlac オペロンのプロモーター、ストレプトマイセス・コ

エリカラー (*Streptomyces coelicolor*) アガラーゼ遺伝子 *dagA* プロモーター、バチルス・リシエニホルミス (*Bacillus licheniformis*)  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (*amyL*) のプロモーター、バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子 (*amyM*) のプロモーター、バチルス・アミロリケファシエス (*B. amyloliquefaciens*)  $\alpha$ -アミラーゼ (*amyQ*) のプロモーター、バチルス・スブチリス (*B. subtilis*) *xylA* 及び *xylB* 遺伝子のプロモーターである。酵母宿主において有用なプロモーターは *eno-1* プロモーターである。菌類宿主における転写のために有用なプロモーターの例は、*A. オリザ* (*A. oryzae*) TAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミーヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ、*A. ニガー* (*A. niger*) 中性  $\alpha$ -アミラーゼ、*A. ニガー* 酸安定性  $\alpha$ -アミラーゼ、*A. ニガー* 又は *A. アワモリ* (*A. awamori*) グルコアミラーゼ (*glaA*)、リゾムコー

ル・ミーヘイ・リパーゼ、*A. オリザ* アルカリ性プロテアーゼ、*A. オリザ*・トリオース・ホスフェート・イソメラーゼ、又は *A. ニドゥランス* (*A. nidulans*) アセレアミダーゼをコードする遺伝子に由来するものである。TAKAアミラーゼ及び *glaA* プロモーターが好ましい。

本発明の発現ベクターは適当な転写ターミネーターを含んで成ってよく、そして真核細胞においては、本発明のラッカーゼをコードするDNA配列に作用可能式に連結されたポリアデニル化配列も含んで成ってよい。転写及びポリアデニル化配列は適切にはプロモーターと同一の起源に由来してよい。このベクターは更にベクターが課題の宿主細胞の中で複製できるようにするDNA配列を含んで成りうる。かかる配列の例はプラスミド *pUC19*, *pACY177*, *pUB110*, *pE194*, *pAMB1* 及び *pIJ702* の複製起点である。

このベクターは更に選択マーカー、例えばその産物が宿主細胞における欠陥を補完する遺伝子、例えば *B. スブチリス* もしくは *B. リシエニホルミス* 由来の *dal* 遺伝子、又は抗生物質耐性、例えばアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールもしくはテトラサイクリン耐性を授ける遺伝子も含んで成りうる。*Aspergillus* 選択マーカーの例には、*amdS*, *pyrG*, *argB*, *niaD*, *sC* 及びヒグロマ

イシン耐性をもたらすマーカー-hygBが含まれる。アスペルギルス・宿主細胞における使用にとって好ましいのはA. ニドウランス又はA. オリザのamdS及びpyrGマーカーである。往々にして利用される哺乳動物のマーカーはジヒドロフォレートリダクターゼ (DHFR) 遺伝子である。更に、選定はW091/17243号に記載の如く、同時形質転換により成し遂げられうる。

一般に発現は細胞外となる産物をもたらすことが好ましい。本発明のラッカーゼはそれ故培養培地に発現タンパク質を分泌させるブ

レ領域を含んで成りうる。所望するなら、このプレ領域は本発明のラッカーゼにとって天然でありうるか、又はプレ領域もしくはシグナル配列により置換されていてよく、それは好都合には反応のプレ領域をコードするDNA 配列の置換により成し遂げられる。例えば、プレ領域はアスペルギルス種由来のグルコアミラーゼ、もしくはアミラーゼ遺伝子、バチルス種由来のアミラーゼ遺伝子、リゾムコール・ミーハイ由来のリパーゼもしくはプロテイナーゼ遺伝子、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) もしくは子牛由来の $\alpha$ -因子についての遺伝子に由来しうる。特に好ましくは、宿主が菌類細胞であるとき、A. オリザTAKAアミラーゼ、A. ニガー中性アミラーゼ、バチルスNCIB 11837由来のマルトジェニックアミラーゼ、B. ステアロサーモフィルス $\alpha$ -アミラーゼ又はバチルス・リシェニホルミススブチリシンである。有効なシグナル配列はA. オリザTAKAアミラーゼシグナル、リゾムコール・ミーハイ・アスパラギン酸プロテイナーゼシグナル及びリゾムコール・ミーハイ・リパーゼシグナルである。

本発明のDNA 構築体、プロモーター、ターミネーター及びその他の因子をそれぞれライゲーションする、並びにそれらを複製にとって必須の情報を含む適当なベクターに挿入するために利用する手順は当業者にとって公知である（例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning*, 1989を参照のこと）。

上記の本発明のDNA 構築体又は発現ベクターのいずれかを含んで成る本発明の細胞は好都合には本発明の酵素の組換え生産における宿主細胞として用いられる。この細胞は本発明のDNA 構築体により、好都合にはそのDNA 構築体を宿主染色体の中に組込むことにより形質転換されうる。この組込みが一般に好都合と解され

、なぜならDNA 配列が細胞の中に安定に維持され易いからである。宿主の染色体

へのDNA 構築体の組込みは例えば相同性又は異種組換により、慣用の方法に従って実施されうる。他方、この細胞は種々のタイプの宿主細胞との関連で上記した通りにして発現ベクターにより形質転換されうる。

宿主細胞は原核細胞、例えば細菌細胞から選定されうる。適当な細菌の例はグラム陽性菌、例えばバチルス・スプチリス、バチルス・リシェニホルミス、バチルス・レントス (*B. lentus*)、バチルス・ブレビス (*B. brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス、バチルス・アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・コアジュランス (*B. coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・ロータス (*B. lautus*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、バチルス・スリンジェンシス (*B. thuringiensis*)、又はストレプトマイセス・リビダンス (*S. lividans*) もしくはストレプトマイセス・ミュリナス (*S. murinus*)、又はグラム陰性菌、例えば *E. coli* である。細菌の形質転換は例えばプロトプラスト形質転換により、又は本質的に公知の態様でコンピテント細胞を利用することにより行ってもよい。

宿主細胞は真核系、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞又は好ましくは菌類細胞、例えば酵母及び糸状菌類であってもよい。例えば、有用な哺乳動物細胞にはCHO 又はCOS 細胞が含まれる。酵母宿主細胞はサッカロマイセス又はシゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) の種、例えばサッカロマイセス・セレビジエから選定されうる。有用な糸状菌類はアスペルギルス種から選定され得、例えばアスペルギルス・オリザ又はアスペルギルス・ニガーである。他方、フサリウム種の株、例えば *F. oxysporum* を宿主細胞として利用できうる。菌類細胞は、本質的に公知の態様でのプロト

プラスト形成及びプロトプラストの形質転換、その後の細胞壁の再生により形質転換してよい。アスペルギルス宿主細胞の形質転換のために適当な手順はEP 238,023号に記載されている。フサリウム種を形質転換するのに適当な方法はMalardier ら、1989により述べられている。

従って、本発明は本発明の組換ラッカーゼを生産する方法を提供し、この方法は上記の宿主細胞を酵素の産生を誘導する条件下で培養し、そして酵素を細胞及び／又は培養培地から回収することを含んで成る。細胞を培養するのに用いられる培地は課題の宿主細胞を増殖させ、且つ本発明のラッカーゼの発現を獲得するのに適当な任意の慣用の培地であってよい。適当な培地は商業的供給者から入手できるものであるか、又は公開の処方に従って調製されうるものである（例えば、アメリカンタイプ・カルチャー・コレクションのカatalogに記載）。

好適な態様において、培養物中のラッカーゼの組換生産は過剰量の銅の存在下で達成される。培養培地に添加する微量金属は少量の銅を含むが、本発明との関連で行う実験は培地への銅添加物の添加が活性酵素の収量を何倍にも高めうることを示す。好ましくは、銅は培地に可溶性形態で、好ましくは可溶性銅塩の形態で、例えば塩化銅、硫酸銅又は酢酸銅の形態で添加する。培地中の銅の最終濃度は0.2～2mMの範囲、好ましくは0.05～0.5mMの範囲にあるべきである。この方法は任意の組換的に生産した菌類ラッカーゼ、及びその他の銅含有酵素、特にオキシドリダクターゼの収量を高めるのに利用できる。

得られる酵素は培地から、慣用の手順、例えば遠心又は濾過により培地から細胞を分離させ、上清液又は濾液のタンパク質性成分を塩、例えば硫酸アンモニウムにより沈殿させ、次いで様々なクロマ

トグラフィー手順、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等により精製することにより、回収できうる。好ましくは、単離したタンパク質はSDS-PAGEによる決定に従い約90%の純度でなり、その純度は食品、ジュース又は洗剤の用途において最も重要である。

特に好適な態様において、ラッカーゼの発現は菌類宿主細胞、例えばアスペルギルスにおいて達成される。以下の実施例において詳細に説明する通り、ラッカーゼ遺伝子はアスペルギルス・オリガTAKA $\alpha$ -アミラーゼプロモーター及びアスペルギルス・ニドゥランスamdS選択マーカーを含むプラスミドの中にライゲーションする。他方、amdSが独立したプラスミドの上であり、そして同時形質転換に

において利用できる。1又は複数のプラスミドを、アスペルギルス種の宿主細胞、例えばA. オリザ又はA. ニガーをYeltonら (PNAS USA 81: 1470-1474, 1984)に記載の方法に従って形質転換するために利用する。

当業者は、本発明が本明細書に詳しく開示してある核酸フラグメント、例えば図1におけるその利用に限定されないことを理解するであろう。本発明は、図1に示しているのと同じアミノ酸配列をコードするが、しかし遺伝子コードの縮重により特定表示のヌクレオチド配列と異なるヌクレオチド配列を包括することも明らかであろう。また、本明細書及び請求の範囲における図1に対する言及は、その中に記載のゲノム配列並びに対応のcDNA及びRNA配列を包括することが理解され、そして本明細書において用いる「DNA構築体」及び「核酸配列」なる語はその全ての変異体を包括することが理解されるであろう。「DNA構築体」は一般に一本鎖又は二本鎖のいずれかのDNA分子を意味することが理解され、それは天然遺伝子から部分形態で単離されているか、又は天然では存在していないよう

な態様で結合及び並んでいるDNAのセグメントを含むように改変されている。

本明細書に記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼは、その比活性が論じられているその他の公知の子囊菌綱又は不完全菌類と比べ、シリungalダジン基質に対して極めて高い比活性を有する。本発明はその他の子囊菌綱及び／又は不完全菌類ラッカーゼをも単離せしめうる手段を提供する。本明細書に特異的に例示したもの以外の起源からのラッカーゼ遺伝子の同定及び単離は本実施例に記載の方法の利用により、公的に入手できる子囊菌綱及び不完全菌類株によって達成できる。特に、本明細書に開示の特定の配列は標準のPCR又はサザンハイブリダイゼーション技術により類似のラッカーゼ遺伝子を単離するうえで有用なプライマー及び／又はプローブをデザインするのに利用できる。従って、本発明は約30SOU/mg以上、そして好ましくは約40SOU/mg以上の比活性を有する子囊菌綱及び不完全菌類ラッカーゼを包括する。「SOU」は至適pHで基質としてシリungalダジンを用いて測定して、1分間当りに酸化される基質の $\mu\text{mole}$ 量として定義する。

更に、本発明はその他のマイセリオフトラ・ラッカーゼを包括し、例えばM. サーモフィラにおいて見い出せうるラッカーゼの別の形態、及びVan Oorschot,



1977、前掲による定義に従ってマイセリオフトラの定義内に属するその他の菌類において見い出せうるラッカーゼを含む。本明細書において特異的に例示したものの以外の起源からのラッカーゼ遺伝子の同定及び単離は本実施例に記載の方法の利用により、公的に入手できるマイセリオフトラ株を用いて達成されうる。他方、本明細書に開示の配列は標準のPCR 又はサザンハイブリダイゼーション技術によりラッカーゼ遺伝子を単離するうえで有用なプライマー及び／又はプローブをデザインするために利用で

きうる。その他の名称のマイセリオフトラ種には、マイセリオフトラ・ヒンヌレア (M. hinnulea) (Awaoら、Mycotaxon, 16 : 436-440, 1983)、マイセリオフトラ・バレレア (M. vellerea) (Guarroら、Mycotaxon, 23 : 419-427, 1985) 及びマイセリオフトラ・レテア・コスタンチン (M. lutea Costantin) が含まれる。また、別名のラッカーゼ、例えばマイセリオフトラ属の種又は株のアナモルフ又は完全状態も包括される。マイセリオフトラの株は数多くの培養物寄託機関において容易に公的にアクセス可能である。例えばATCC 48102, 48103, 48104等 ; CBS 117.65, 131.65, 379.65等 ; DSM 1799 (M. サーモフィラ)、ATCC 52474, CBS 539.82, 540.82等 (M. ヒンヌレア)、DSM 62114, DBS 146.50, 147.50, 157.51等 (M. ルテア)、並びにCBS 478.76, 479.76及び715.84 (M. ベレレア)。本発明は更に任意の変異ヌクレオチド配列及びそれによりコードされるタンパク質を包括し、そのタンパク質は図1に示すアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは85%以上、そして最も好ましくは90~95%以上の相同性を保持し、そしてそれは本明細書記載の配列のラッカーゼ活性を定性的に保持している。上記のカテゴリー内における有用な変異体には例えば保存アミノ酸置換されているものが含まれ、その置換はタンパク質の活性に有意な影響を及ぼさないものとする。保存置換とは、同じクラスのアミノ酸がそのクラスの任意の別のものにより置換されうることを意味する。例えば、非極性脂肪族残基Ala, Val, Leu及びIleは、塩基性残基Lys 及びArg、又は酸性残基Asp 及びGlu と同様に相互変換してよい。同様に、Ser 及びThr は、Asn 及びGln と同様に、互いと保存置換の関係にある。かかる置換は分子の機能にとって重要な領域の外部で成し得、従って未だ活性な

酵素をもたらすことが当業者にとって明らかであろう。所望の活性の保持は標準のABTS酸化法、例えば本実施例に記載

のそれを実施することにより容易に決定できる。

タンパク質は数多くの様々な産業的プロセスにおいて利用できる。これらのプロセスは高分子量を有するリグニンを製造するための、リグニンのクラフト及びリグノスルフェートの双方での溶液重合が含まれる。中性／アルカリ性ラッカーゼは、クラフトリグニンが高めのpHで一層可溶性である点で特に有利である。かかる方法は例えばJin ら、*Holzforshung* 45(6) : 467-468, 1991 ; 米国特許第 4, 432, 921号 ; EP 0, 275, 544号 ; PCT/DK93/00217, 1992に記載されている。

本発明のラッカーゼはクラフトパルプにおけるリグニンのin-situ脱重合のためにも利用でき、これにより低リグニン含有量を有するパルプが製造できる。ラッカーゼの利用はリグニンの脱重合のための現状の塩素の利用よりも優れる。塩素の利用は塩素化芳香族化合物の生成を招き、それは製紙工場の環境的に望ましくない副産物である。かかる利用は例えば *Current opinion, Biotechnology* 3 : 261-266, 1992 ; *J. Biotechnol.* 25 : 333-339, 1992 ; Hiroi ら、*Svensk papers tidning* 5 : 162-166, 1976に記載されている。製紙工場における環境は一般にアルカリ性であるため、該ラッカーゼは、酸性条件下で最も良く機能するその他の公知のラッカーゼよりもこの目的にとってより有用である。

染料及び染料前駆体、並びにその他の発色化合物の酸化は化合物の脱色を招く。ラッカーゼはこの目的のために利用でき、それは布帛間での染料の転移が望ましくないとき、例えば繊維産業及び洗剤産業における状況において極めて好都合でありうる。染色転移阻害及び染料の酸化のための方法はW092/01406号 ; W092.1 8683号 ; EP 0, 495, 836号 ; Calvo, *Mededelingen van de Faculteit Landboum-wetenschappen/Rijksuniversitet Gent.* 56 : 1565-1567, 1991 ; T

sujino ら、*J. Soc. Chem.* 42 : 273-282, 1991において見い出せうる。

ラッカーゼは毛髪の色における利用に極めてよく適する。かかる用途においては、ラッカーゼを染料前駆体と好ましくは毛髪の上で接触させ、これにより染

料前駆体の制御された酸化が達成され、前駆体は染料へと又は顔料生成化合物、例えばキノイド化合物へと変換される。染料前駆体は好ましくは3種の主要化学族、即ちジアミン類、アミノフェノール類（又はアミノナフトール類）及びフェノール類のいずれかに属する芳香族化合物である。染料前駆体は単独又は組合せで利用できる。共重合にける中間体の少なくとも一種はオルトーもしくはパラアミン又はアミノフェノール（一次中間体）でなくてはならない。かかるものの例は後述の第IV章に見い出され、そしてp-フェニレンジアミン(pPD)、p-トルイレンジアミン、クロロ-p-フェニレンジアミン、p-アミノフェノール、o-アミノフェノール、3, 4-ジアミノトルエンが含まれる。米国特許第 3, 251, 742号にはその他の化合物も記載されており、その内容は引用することで本明細書に組入れる。一の態様において、出発材料は酵素及び一次中間体のみでなく、更には改質剤（カップラー）（又は改質剤の組合せ）も含み、その改質剤は一般にメタージアミン、メターアミノフェノール又はポリフェノールである。改質化合物の例にはm-フェニレンジアミン、2, 4-ジアミノアニソール、 $\alpha$ -ナフトール、ヒドロキノン、ピロカテコール、レゾルシノール及び4-クロロレゾルシノールが含まれる。次いで改質剤をラッカーゼの存在下で一次中間体と反応させ、それを有用化合物に変換させる。別の態様において、ラッカーゼは一次中間体と直接、それを有色化合物へと酸化するため、利用してよい。全てのケースにおいて、染色工程は1又は複数種の一次中間体により

、単独で、又は1もしくは複数種の改質剤と組合せて行ってよい。成分の量の類似の成分についての通常の商業的な量に応じ、そして成分の比はそれに従って変えられうる。このラッカーゼの利用はより伝統的な $H_2O_2$ の利用よりも、その後者が毛髪に損傷を及ぼし、そしてその利用が通常高いpH（これも毛髪を損傷せしめる）を必要とするという点で、優れている。反対に、ラッカーゼとの反応はアルカリ性、中性又は酸性のpHでさえも行うことができ、そして酸化のために必要な酸素は苛酷な化学酸化を介するではなく、大気に由来する。マイセリオフトラ・ラッカーゼの利用により供される結果は $H_2O_2$ の利用により達成されるそれに匹敵し、それは発色のみならず、洗濯安定性及び輝度の消失性においてもそうである

。更なる商業的な利点は、ラッカーゼ及び前駆体の無酸素雰囲気の中での単一容器包装にあり、そのような方式は $H_2O_2$ の利用は不可能である。

該ラッカーゼは液体の中に存在するフェノール系化合物の重合のためにも利用できる。かかる有用性の例はジュース、例えばアップルジュースの処理により、ラッカーゼはジュースの中に存在するフェノール系化合物の沈殿を促進せしめ、それ故一層安定なジュースが製造されるようになるであろう。かかる用途はStutz, Fruit processing 7/93, 248-252, 1993; Maier ら、Dt. Lebensmittel-rindschau 86(5): 137-142, 1990; Dietrich ら、Fluss. Obst 57(2): 67-73, 1990 に記載されている。

ラッカーゼ、例えばマイセリオフトラ・ラッカーゼは土壌の解毒においても有用である (Nannipieri ら、J. Environ. Qual. 20: 510-517, 1991; Dec and Bolag, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 543-550, 1990) 。

本発明を以下の非限定的な実施例により更に説明する。

## 実施例

### 1. マイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼ遺伝子の単離

#### A. 材料及び方法

##### 1. DNA の抽出及びハイブリダイゼーション分析

全細胞DNA を、以下のプロトコールを利用して、25ml の YEG 培地 (0.5% の酵母抽出物、2% のグルコース) の中で 24 時間増殖させたマイセリオフトラ・サーモフィラ株 E421 の菌類細胞から抽出した：菌糸体を Miracloth (Calbiochem) を通じる濾過により集め、そして 25ml の TE バッファーで 1 回洗った。よけいなバッファーを菌糸体から除き、菌糸体を液体窒素の中で凍結した。凍結した菌糸体を電気コーヒーグラインダーで微粉末に碎き、そしてその粉をディスポーザブルプラスチック遠沈管中の 20ml の TE バッファー及び 5ml の 20% の SDS (w/v) に加えた。この混合物を静かに数回反転させて混合を確実なものとし、そして等容量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) で 2 回抽出した。酢酸ナトリウム (3M の溶液) を 0.3M の最終濃度となるように加え、そして核酸を 2.5 容量の氷冷エタノールで沈殿させた。これらのチューブを 15,000 × g

で30分遠心し、そしてそのペレットを30分風乾させ、次いで 0.5mlのTEバッファーの中に再懸濁させた。DNase 非含有リボヌクレアーゼAを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように加え、そしてその混合物を $37^{\circ}\text{C}$ で30分インキュベーションした。プロテイナーゼK ( $200\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加え、そして各チューブを更に1時間 $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションした。最後に、各サンプルをフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールで2回抽出し、次いで酢酸ナトリウム及びエタノールでDNAを沈殿させた。DNAペレットを真空で乾かし、TEバッファーの中で再懸濁し、そして $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 形質転換及び未形質転換コントロール株由来の全細胞DNA サンプ

ルをサザンハイブリダイゼーションにより分析する。約 $5\mu\text{g}$ のDNAをEcoRIにより消化し、そして1%のアガロースゲル上でサイズ分別する。このゲルを短波長UV下で写真撮影し、そして0.5MのNaOH, 1.5MのNaCl中に15分、次いで1Mのトリス-HCl, pH 8, 1.5MのNaClの中で15分浸す。ゲル中のDNAをZeta-Probe (商標) ハイブリダイゼーション膜(BioRad Laboratories)上に $20\times$ のSSPE (R. W. Davis ら、Advanced Bacterial Genetics, A Manual for Genetic Engineering, Cold Spring Harbor Press, 1980) 中でのキャピラリーブロッティングにより移す。膜を2時間、 $80^{\circ}\text{C}$ 、真空下で焼き、そして以下のハイブリダイゼーションバッファーの中で $45^{\circ}\text{C}$ にて静かに攪拌しながら浸す： $5\times$ SSPE, 35%のホルムアミド (v/v)、0.3%のSCS,  $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性且つ剪断したサケ精巢DNA。N. クラッサ lcc1 遺伝子の5' 領域をコードするラッカーゼ特異性プローブフラグメント (約1.5kb) をN. クラッサ・ゲノムDNA から、標準のPCR 条件 (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA) を利用し、以下のプライマーペアを用いて増幅させる：フォワードプライマー5' CGAGACTGATAACTGGCTTGG 3' ; リバープライマー5' ACGGCGCATTGTCAGGGAAGT 3'。増幅させたDNAセグメントをまずTA-クローニングベクター (Invitrogen, Inc., San Diego, CA) の中にクローニングし、次いでアガロースゲル電気泳動により精製し、そしてEcoRIで消化する。精製したプローブフラグメントを $\alpha$  [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP (Amersham) によるニックトランスレーションにより放射能ラベルし、そしてバッファー1ml当たり約 $1\times 10^6\text{c}$

pm の活性においてハイブリダイゼーションバッファーに加える。その混合物を振盪浴槽中で45℃にて一夜インキュベーションする。インキュベーション後、膜を0.2×のSSPEと0.1%のSDSで45℃において1回洗い、次いで0.2×のSSPE(SDSなし)で同じ温度で2回洗う。膜

をペーパータオル上で15分かけて乾かし、次いでSaran Wrap (商標) の中に包み、そしてX線フィルムに-70℃で増強スクリーン(Kodak)を伴って一夜曝露する。

## 2. ラッカーゼクローンのDNAライブラリー及び同定

ゲノムDNAライブラリーをバクテリオファージクローニングベクターλ-EMBL 4の中で構築する(J. A. Sorge. Vectors, A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Rodrigues ら、編pp43-60, Butterworths, Boston, 1988)。簡単には、全細胞DNAをSan 3Aで部分消化し、そして低融点アガロースゲル上でサイズ分別する。9 kb~23kbの間で泳動するDNAフラグメントを切り出し、そしてβ-アガラーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いてゲルから溶出させる。溶出したDNAフラグメントをBamH1で切断し、且つ脱ホスホリル化したλ-EMBL 4ベクターアームにライゲーションし、そしてそのライゲーション混合物を商業的なパッケージング抽出物(Stratagene, La Jolla, CA)を用いてパッケージングする。パッケージングしたDNAライブラリーをプレート培養し、そしてエッシャーヒア・コリK802細胞上で増殖させる。各ライブラリー由来の約10,000~20,000プラークを上記の条件を利用し、放射能ラベルした1001 DNAフラグメントとのプラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングする。このプローブとのハイブリダイゼーションシグナルを出すプラークをE. コリK802細胞上に基づいて2回精製し、そして対応のファージ由来のDNAをQiagen Lambda kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA)を用い、高力価リゼートから精製する。

## 3. ラッカーゼ遺伝子の分析

ラッカーゼクローンの制限地図化を標準の方法を利用して行う(Lewin, Genes, 第2版, Wiley & Sons, 1985, New York)。DNA配

列決定はApplied Biosystemsモデル373A自動化DNA シーケンサー (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)により、色素ターミネーター化学によるプライマー歩行技術を利用して行う (H. Giesecke ら、J. Virol. Methods 38: 47-60, 1992)。オリゴヌクレオチド配列決定用プライマーはApplied Biosystemsモデル394 DNA/RNA シンセサイザーで合成する。

## B. 結果及び考察

### 1. ラッカーゼ遺伝子配列の同定

全細胞DNA サンプルをニューロスポラ・クラッサ、ボツリチス・シネレア (B. cinerea) 及びマイセリオフトラの種から調製する。これらのDNA 調製品のアリコートにBamH Iで消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により分別する。ゲル中のDNA をZeta-Probe (商標) 膜フィルター (BioRad Laboratories, Hercules, CA) にブロッティングし、そして前述の通りにしてN. クラッサ loc 1 遺伝子の一部をコードする放射能ラベルしたフラグメントと温和なストリンジェンシーの条件下でプロービングする。ラッカーゼ特異性配列はM. サーモフィラ及びN. クラッサ・コントロールのゲノムにおいて検出されるが、B. シネレアゲノムDNA においてはこのプローブでは検出されない。

### 2. マイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼ (Mtl) 遺伝子のクローニング及び特性決定

λ-EMBL 4 クローニング用ベクターの中に構築したM. サーモフィラゲノムDNA ライブラリー由来の約20,000のプラークをスクリーニングする。このライブラリーは約10,000個の独立クローンより成り、インサートは9 kbから23 kbのサイズに範囲した。M. サーモフィラについて平均インサートサイズを10 kb、そして全ゲノムサイズを  $4 \times 10^7$  bpと仮定して、この数字は全ゲノムを表示するのに必要

とされるクロンの数の約 2.5倍である。8つのプラークがN. クラッサ・ラッカーゼ遺伝子と強くハイブリダイズすることが同定された。DNA をそのうちの3つから単離し、EcoR Iで消化し、そしてアガロースゲル電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションにより分析する。これらの3つのクローンは全てラッカーゼ特異性プローブとハイブリダイズする 7.5 kbのEcoR I フラグメントを含む。これ

らのEcoR I フラグメントの1つをpBR322(Bolivar ら、Gene 2 : 95-113, 1977) にサブクロニングしてプラスミドpRaMB1を作り上げる。このDNA セグメントの制限地図を図1に示す。このクローン上のラッカーゼコード領域の位置を上記のlcc1 遺伝子フラグメントとのハイブリダイゼーションにより決定する。得られる地図データ、及び約80kdaのラッカーゼタンパク質の推定サイズに基づき、全M. サーモフィララッカーゼコード領域は3.2kbのNhe I -Bgl IIセグメントを含むことと判定され、そのセグメントをpUC119 (Viera and Messing, Methods Enzymol. 153 : 3-11, 1987) の中にサブクロニングする。このセグメントのヌクレオチド配列をプライマー歩行法(Gieseckeら、前掲)を用いて決定する。核酸配列を図2及びSEQ ID NO : 1に示す。

MtL の推定アミノ酸配列をN. クラッサラッカーゼとのアミノ酸配列相同性に基づき得る。アミノ酸レベルは、これら2種類のラッカーゼは約60%の配列同一性を共有する。トリヌクレアー銅クラスターの形成に関与する4個のヒスチジン及び1個のシステインに対応する領域において類似性が最も高い(Perry ら、J. Gen. Microbiol. 139 : 1209-1218, 1993; Coll ら、Appl. Environ. Microbiol. 59 : 4129-4135, 1993; Messerschmidtら、J. Mol. Biol. 206 : 513-530, 1989)。MtL の推定アミノ酸配列におけるN-連結化グリコシル化にとって11個の潜在部位がある。MtL の最初の22個の

アミノ酸はAla 残基の後方に推定切断部位のある標準的なシグナルペプチドを含んで成ることが認められた(von Heijne, J. Mol. Biol. 173 : 243-251, 1984)。天然MtL のアミノ末端配列は未知であるが、A. オリザにおいて生成される組換えMtL のアミノ末端はパイログルタミン酸残基によりブロックされている。この残基の酵素的除去、それに続くアミノ酸配列決定は成熟MtL がGln 残基(図2において1位; SEQ ID NO : 2)で始まることを示唆する。即ち、MtL は22個のアミノ酸のシグナルペプチド及び25残基のプロペプチドを有する620個のアミノ酸のプレプロ酵素として合成されることが明らかである。ニューロスポラ・クラッサ・ラッカーゼ(NcL)は同様にしてそのアミノ末端でプロセッシングされる。更に、NcL もそのC末端でタンパク質分解的にプロセッシングされ、13個のアミノ



酸の除去がもたらされる (Germann ら、J. Biol. Chem. 263 : 885-896, 1988)。  
。プロセッシング部位は配列 Asp-Ser-Gly-Leu\* Arg558 (ここで \* は切断部位を示す) 内に含まれる。類似の配列がMtL のC末端付近 (Asp-Ser-Gly-Leu-Lys560) にあり、マイセリオフトラ酵素がC末端プロセッシング (Asp-Ser-Gly-Leu\* Lys560) にも委ねられ、12個のアミノ酸が除去されることを示唆する。

Icc 1 コード領域内の6つのイントロン (85, 84, 102, 72, 147及び93ヌクレオチド) の位置は、MtL の推定アミノ酸配列をNcL のそれと対比させることにより、及び糸状菌類におけるイントロンの特徴に関する共通の原則 (Gurr ら、Gene Structure in Eukaryotic Microbes, J. R. Kinghorn 編 pp93-139, IRL Press, Oxford, 1987) を適用することにより決定される。イントロンを除く1860ヌクレオチドのコード配列はグアノシン及びシトシンリッチである (65.5%のGtC)。この遺伝子に関するコドン用法パターンは、G又はCで終えるコドンについての強力な偏り (89.7%) のDNA 塩基組成を

反映する。

## II. アスペルギルスにおけるマイセリオフトラ・ラッカーゼの発現

### A. 材料及び方法

#### 1. 細菌及び菌類宿主株

エッシェリア・コリ JM101 (Messing ら、Nucl. Acids Res. 9 : 309-321, 1981) を本研究におけるラッカーゼ発現ベクターの構築及びルーチン的な増殖のための宿主として用いる。ラッカーゼ発現のための菌類宿主にはアスペルギルス・ニガー株Bo-1, AB4.1 及びAB1.13 (Mattern ら、Mol. Gen. Genet. 234 : 332-336) 並びに $\alpha$ -アミラーゼ欠損アスペルギルス・オリザ株How B104のウリジン要求 (pyrG) 突然変異体が含まれる。

#### 2. プラスミド

プラスミドpRaMB2はMtL をコードするM. サーモフィラゲノムDNA の 3.2kbの BglIII-Nhe I フラグメントを含む。ベクターpMWRはpUC18 (Yanisch-Perron ら、Gene 33 : 103-119, 1985) の中にA. オリザTAKA-アミラーゼプロモーター及びpTAKA17由来のターミネーター因子 (Christensen ら、Bio/Technol. 6 : 1419-

1422, 1988 ; EP 238, 023号) を挿入することにより構築する。このベクターにおいて、プロモーター因子の終点に固有 *Swa* I 部位があり、そしてターミネーターの始点にコード配列の指令的クローニングのための単一 *Nsi* I 部位がある。クローニング用ビヒクルpUC518はpUC118 (Vieira and Messing、前掲) の隣接し合う *Bam* H I 及び *Xba* I 部位の間に *Nsi* I, *Cla* I, *Xho* I 及び *Bgl* II 制限部位を含む小さなリンカーを挿入することにより誘導する。プラスミドpToC68 (W091/17243) はA. オリザTAKA-アミラーゼプロモーター及びA. ニガー *glaA* ターミネーターを含み、そしてpToC90 (W091/17243) はA. ニドゥランス *amdS* 遺伝子を担持する。

### 3. ラッカーゼ発現ベクターの構築

ラッカーゼ発現ベクターpRaMB5についての構築手法を図3に概略する。ラッカーゼ遺伝子の転写を指令するプロモーターはA. オリザ $\alpha$ -アミラーゼ (TAKA-アミラーゼ) 遺伝子 (Christensen ら、前掲) 及びTAKA-アミラーゼターミネーター領域から得られる。このプラスミドは *Swa* I 及び *Nsi* I 部位の間に *Apa* I 部位を含む小さなリカン-を挿入してpMWR3-SAN と称するプラスミドを作り上げることによってpMWR3を改質することにより構築する。Pfu I ポリメラーゼ依存性PCR (Stratagene, La Jolla, CA) を、開始コドンから内部 *Pst* I 部位に至る (約 0.5kb) MTL の5' 部をコードする短いDNA セグメントを増幅するために用いる。このPCR 反応のためのフォワードプライマーは開始コドンのすぐ上流のEcoR I 部位を作り上げるようにデザインされている。次に、増幅フラグメントをEcoR I 及び *Pst* I で消化し (この工程の際、EcoR I 部位はdNTP及びDNA ポリメラーゼ I (クレノウフラグメント) による処理によりブラント化 (接着末端化) する)、そしてアガロースゲル電気泳動により精製する。M. サーモフィラコード領域の3' 部をpRaMB2から2kbの *Pst* I -*Apa* I フラグメントとして切り出す (このセグメントも3' 非翻訳領域から約110bpを含む)。これら2本のフラグメントを *Swa* I -及び *Apa* I -切断pMWR3-SAN と三部ライゲーション反応で組合せ、ラッカーゼ発現ベクターpRaMB5を作る。

### 4. アスペルギルス宿主細胞の形質転換

アスペルギルス株の同時形質転換のための方法はChristensen ら前掲に記載されている。A. オリザHowB104 pyrGへのラッカーゼ発現ベクターの導入のため、等量（約5  $\mu$ g づつ）のラッカーゼ発現ベクター、並びに以下のプラスミドのいずれかを使用する：pPYRG (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, KS) [これはA.

ニドゥランスpyrG遺伝子を含む (Oakleyら、Gene 61 385-399, 1987) ] ; pS02 [これはクローンA. オリザpyrG遺伝子をもつ] ; pPRYG24 [これはA. フィキウム (A. ficuum) (=A. ニガー) pyrG遺伝子を含む]。原栄養性(Pyr<sup>+</sup>)形質転換体をアスペルギルス最少培地 (Rowlands and Turner, Mol. Gen. Genet. 126 : 201-216, 1973) 上で選別し、そしてその形質転換体を1mMの2, 2'-アジノビス (3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸) [ABTS] を含む最少培地上でラッカーゼを産生する能力についてスクリーニングする。活性ラッカーゼを分泌する細胞はABTSを酸化し、コロニーを囲む緑色の輪をもたらす。最後に、A. ニガーBo-1 プロトプラストを等量（約5  $\mu$ g づつ）のラッカーゼ発現ベクター及びA. ニドゥランスamdS (アセトアミダーゼ) 遺伝子 (Hynesら、Mol. Cell Biol. 3 : 1430-1439, 1983) 含有pToC90を用いて同時形質転換する。amdS<sup>+</sup> 形質転換体をCove最少培地 (Cove, Biochim. Biophys. Acta 113 : 51-56, 1966) 上で、炭素源としての1%のグルコース及び唯一の窒素源としてのアセトアミドを伴って選別し、そして1mMのABTSを含むcove培地上でのラッカーゼ発現についてスクリーニングする。

##### 5. ラッカーゼ産生形質転換体の分析

アガープレート上でラッカーゼ活性体を産生する形質転換体を、それから滅菌0.01% Tween-80中の分生子柄及び孢子懸濁物を作ることを通じて2回精製する。各懸濁物中の孢子の密度を光学的に評価する(A<sub>595nm</sub>)。約0.5吸収単位の孢子を、125ml のプラスチック製フラスコ中の25mlのASP04又はMY50培地を接種せしめるために用いる。その培養物を37°Cにて、多大な通気を伴い（約200rpm）、4～5日間インキュベーションする。培養液を遠心により獲得し、そして上清液中のラッカーゼ活性の値を基質としてシリungalダジ

ンを用いて決定する。簡単には、800  $\mu$  l のアッセイバッファー (25mMの酢酸ナトリウム、pH5.5, 40  $\mu$  Mの $\text{CaSO}_4$ ) を20  $\mu$  l の培養上清液及び50%のEtOH中の60  $\mu$  l の0.28mMのシリungalダジン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) と混合する。530nmでの吸収をGenesys 5 UV-ビス光度計 (Milton-Roy) で経時的に測定する。1 ラッカーゼ単位 (LACU) は室温において1分間当り1  $\mu$  moleの基質を酸化する酵素の量と定義する。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) をNovex (San Diego, CA) 由来のプレカスト10~27%グラジエントゲルを用いて行う。タンパク質バンドをクマジー・ブリリアント・ブルー (Sigma) を用いて発色させる。

## B. 結果及び考察

### 1. マイセリオフトラ・ラッカーゼの発現

ラッカーゼ産生形質転換体は選択培地へのABTSの組込みにより検出される。選択マーカーとしてpyrG又はamdSを利用することで、同時形質転換頻度は約30%から70%に変動する。MtL の異種発現はA. オリザ形質転換において最も高いことが認められた。更に、MY50と比べてASP04 培地における方が生産率が良いことが認められ、しかしながらこの理由はわからない。培養液サンプルの SDS-PAGEは約80kdaIにおいて主要ラッカーゼがバンドを示し、それはM. サーモフィラから精製した天然酵素のサイズと類似する。A. ニガーBo形質転換体由来の培養濾液の類似の分析は、ラッカーゼバンドが非常に強いグルコアミラーゼ及び酸安定性アミラーゼタンパク質バンドによりかくされていることを示唆する。結果を表1に示す。

表1. 選定したA. オリザ及びA. ニガー形質転換体間でのMtl 発現

宿主株	形質転換体	形質転換用DNA	MTLACU/ML	
			ASP04	MY50
A. オリザ HowB104 pyrG	未形質転換	なし	0.00	0.00
	RaMB5.15	pRaMB5 + pPYRG	0.85	0.29
	RaMB5.30	pRaMB5 + pPYRG	0.71	0.87
	RaMB5.33	pRaMB5 + pPYRG	0.60	0.26
	RaMB5.108	pRaMB5 + PS02	0.68	0.19
	RaMB5.111	pRaMB5 + PS02	0.70	0.17
	RaMB5.121	pRaMB5 + PS02	0.49	0.20
	RaMB5.142	pRaMB5 + PS02	0.54	0.04
A. ニガー Bo-1	未形質転換	なし	0.00	0.00
	RaMB5.1	pRaMB5 + pToC90	n. d.	0.20
	RaMB5.25	pRaMB5 + pToC90	n. d.	0.09
	RaMB5.49	pRaMB5 + pToC90	n. d.	0.06
	RaMB5.51	pRaMB5 + pToC90	n. d.	0.12
	RaMB5.53	pRaMB5 + pToC90	n. d.	0.21
	RaMB5.62	pRaMB5 + pToC90	n. d.	0.16

n. d. = 未測定

## 2. 過剰の銅の有無での発現

アスペルギルス・オリザ形質転換体HowB104-pRaMB5.30(約 $10^9$  孢子/ml)の孢子懸濁物1mlのアリコートが無菌的に100mlの無菌振盪フラスコ培地(マルトース50g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10g/l;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  2g/l;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l; クエン酸2g/l; 酵母抽出物10g/l; 微量金属 [ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.143g/l;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2.5g/l;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

20 13.8 g/l ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  8.5 g/l ; クエン酸 3.0 g/l ]、0.5 ml/l ; 尿素 2 g/l ; 水道水でメスアップし、オートクレーブにかける前に pH 6.0 に調整) を含む 500 ml の振盪フラスコに入れ、そして 37°C においてロータリーシェーカー上で 200 rpm にて 18 時間インキュベーションする。この培養物 50 ml を無菌的に 1.8 リットルの発酵培地 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/l ; クエン酸 4 g/l ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  3 g/l ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 g/l ; 微量金属 0.5 ml/l ; プルロニック発泡抑制剤 1 ml/l) を含む 3 リットルの発酵槽に移す。この発酵槽の温度は発酵槽ジャケットを通じる冷却水の循環により 34°C に保つ。無菌エアを 1.8 リットル/分 (1 v/v/m) の率で発酵槽に散布する。搅拌速度は培養物中の溶解酸素レベルを 20% より高く保つのに必要とされるほぼ最低レベルである 600~1300 rpm に維持する。無菌添加物 (Nutriose 725 [マルトースシロップ] 225 g/l ; 尿素 30 g/l ; 酵母抽出物 15 g/l ; プルロニック発泡抑制剤 1.5 ml/l ; 蒸留水でメスアップし、そしてオートクレーブにかける) をペリスターポンプを利用して発酵槽に加える。発酵の際の供給速度は以下の通りとする : 接種前は当初 30 g の添加物 ; 0~24 h 2 g/l h ; 24~48 h 4 g/l h ; 48 h-終了 6 g/l h。

銅を水又は適当なバッファー中で 400× のストックとして調製し、無菌濾過し、そして無菌的にタンクに 0.5 mM の最終レベルとなるように加える。上記の発酵をタンク培地への銅添加物の添加抜きでも行う。酵素活性の決定のためのサンプルを抜き取り、そして Miracloth で濾過して菌糸体を除去する。これらのサンプルを上記の LACU アッセイにより ラッカーゼ活性についてアッセイする。ラッカーゼ活性は発酵中に連続的に上昇することが認められ、過剰の銅を含

む発酵においては 180 時間後に約 45 LACU/ml の値が達成される。22 LACU/mg の比活性において、これは 2 g/l の発現組換ラッカーゼに相当する。他方、銅添加物抜きの発酵において達成される最大ラッカーゼ活性は 170 時間後に約 10 LACU/ml であり、添加銅の存在下で見い出せる値の約 25% であった。

### III. マイセリオフトラ・ラッカーゼの精製及び特性決定

#### A. 材料及び方法

### 1. 材料

バッファー及び基質として用いる化学試薬は最低でも試薬級の商品とする。エンド／N-グリコシダーゼF及びパイログルタミン酸アミノペプチダーゼをBoehringer Mannheim より購入した。クロマトグラフィーはPharmacia FPLC又は慣用の低圧システムのいずれかで行う。吸光アッセイは光度計 (Shimadzu PC160) 又はマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) のいずれかで行う。Britton & Robinson (B & R) バッファーをQuelle, Biochemisches Taschenbuch, H. M. Raven, 11. Teil, S. 93u, 102, 1964 に記載のプロトコールに従って調製する。

### 2. 酵素活性

ラッカーゼ活性はシリungalダジン酸化により、30℃にて1-cm石英キュベットの中で決定する。60  $\mu$  l のシリungalダジンストック溶液 (50%のエタノール中0.28mM) 及び20  $\mu$  l のサンプルを0.8mlの予備加熱したバッファー溶液と混合する。酸化は5分間にわたり 530nmでモニターする。活性は1分間当りに酸化された基質の  $\mu$  moleとして表示する。様々なpHのB & Rバッファーを使用する。活性単位はここでは「SOU」と称する。上述の通りLACUと称する活性を決定するために25mMの酢酸ナトリウム、40  $\mu$  MのCuSO<sub>4</sub>, pH5.5のバッファーも使用する。2, 2'-アジノビス (3-エチルペン

ゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) 酸化アッセイは 0.4mMのABTS, B & R バッファー、pH4.1 を用い、室温においてA<sub>405</sub>をモニターすることにより行う。ABTSオキシダーゼ活性上層 (オーバーレー) アッセイは、冷却したABTS-アガロース (0.05 g のABTS, 1 g のアガロース、50mlのH<sub>2</sub>O、アガロースを溶かすために加熱) を自然IEF ゲルの上に注ぎ、そして室温でインキュベートすることにより行う。ラッカーゼ (r-MtL) の熱安定性分析は、B & RバッファーpH6の中で様々な温度において予備インキュベーションした3 SOU 活性を有するサンプルを用いて行う。サンプルは同じバッファーに400倍に希釈してから室温でアッセイする。

### 3. 発酵培養液からの精製

3. 7リットルのチーズクロス濾過した培養液 (pH7.6, 16mS) をWhatman #2濾紙で濾過する。その培養液をS1Y100膜 (MWC0:100) の付いたSpiral Concentrator (Amicon) で3700mlから200mlへと濃縮する。その濃縮液を水に希釈することにより0.75mSに調整し、そしてS1Y100で170mlに再濃縮する。洗浄且つ濃縮した培養液は濃緑色を帯びた色調を有する。

その培養液を-20℃で一夜凍結し、翌日融解し、そして10mMのトリス、pH7.5, 0.7mS (バッファーA) で予備平衡化しておいたQ-sepharose XK26カラム (120ml) に載せる。青色のラッカーゼバンドは添加中にカラムをゆっくり下降する。青色画分の1のグループは添加及びバッファーAによる洗浄の後にはカラムを通り抜ける。第2グループはバッファーB (バッファーAと2MのNaCl) による線形勾配の際に溶出する。ラッカーゼ活性のない一部の茶色の物質は1MのNaOHによりその後溶出する。SDS-PAGE分析はこの調製が純粋なラッカーゼをもたらすことを示す。

#### 4. アミノ酸含有量、グリコシル化の程度及びN-末端配列の分析

##### 析

N-末端配列決定をABI 476Aシーケンサーで行う。全アミノ酸分析 (それからr-MtLの励起係数を決定) をHP Amino Quant装置で実施する。脱グリコシル化はエンド/N-グルコシダーゼFを用いて製造業者の仕様書に従って行い、そして炭水化物含有量はSDS-PAGEにより決定される移動度の相違により評価する。パイログルタミン酸アミノペプチダーゼによるN-末端の脱ブロッキングは製造業者の仕様書に従って実施する。約80 $\mu$ gのr-MtLを4 $\mu$ gのペプチダーゼにより、1Mの尿素又は0.1MのグアニジンHClの存在下又は非存在下で処理し、次いで配列決定のためにPVDF膜にブロッティングする。約20pmolの脱ブロッキングされたタンパク質が得られ、そして配列決定する。

SDS-PAGE及び自然IEF分析はNovexセル又はMini proteanII及びモデルIII Mini IEFセル (Bio-Rad) のいずれかで行う。ゲル濾過分析はSephacryl S-300 (Pharmacia) で行い、それより自然MWをカラムを校正するためのブルーデキストラン (2000kda)、牛IgG (158kda)、牛血清アルブミン (66kda)、オバル



ブミン (45kda) 及び馬心臓ミオグロビン (17kda) を用いることにより推定する。

## B. 結果及び考察

### 1. 発酵培養液からの r-MtL の精製及び特性決定

3.71の発酵培養液から、約2～3 gの r-MtL が単離される。100kdaのMWC0を有する膜を用いる最初の濃縮は有意な量の茶色物質及び少量の夾雑タンパク質を除去した。10mMのトリス、pH7.5 で平衡化しておいたQ-Sepharose マトリックスに対する r-MtL の低親和力はその他のより酸性、且つより強く結合した不純物からのその分離を助長する。SDS-PAGEにより示される通り、この調製はピ

ークのまわりに位置している最も活性な画分に関する本質的に純粋なラッカーゼをもたらした。その他の活性の弱い画分はより浅い勾配による Mon-Q 又はゲル濾過カラム、例えばS-300 のいずれかで更に精製でき、それより夾雑物は小さなMWに基づき分離される。総合的に18倍の精製度及び67%の回収率が達せられる。以下に記載の通り、Q-Sepharose クロマトグラフィーでの r-MtL の2本の溶出バンドの存在はおそらくは示差的なグリコシル化に基づく。

精製した r-MtL はS-300 ゲル濾過で 100～140kdaのMW、そして SDS-PAGEで85kdaのMWを示す。脱グリコシル化後の SDS-PAGEでの r-MtL の移動度の上昇は炭水化物がその全質量の14%を占めることを示す。自然IEF はABTSオーバーレーアッセイにおいて活性なpI～4.2 の主要バンドを示した。

脱塩した溶液又はPVDF膜のいずれかのサンプル由来の精製 r-MtL のN-末端の直接配列決定は不成功に終わった。しかしながら、パイログルタミン酸アミノペプチダーゼによる r-MtL の処理は脱ブロッキングされたN-末端を有するタンパク質をもたらした。これは、r-MtL の成熟化の際のプロペプチドのプロセッシング、即ち、リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani)の如きその他のラッカーゼにおいては認められないが、N. クラッサ・ラッカーゼのそれに類似する後翻訳現象を示唆する。考えられるスキームを以下に概略する。

MKSPISAATLWIVGILTPSVAAAPPSTBPQRDLLVPITEREEAAVKARQQSCNTPS

| < - 推定シグナルペプチド - > | < - 推定ポリペプチド - > | < -N- 末端

青色の r-MtL のスペクトルは 276及び 589nmにて最大吸収を有していた。

ラッカーゼの活性を基質としてシリングアルダジン及びABTSのいずれかを用いて試験する。Abs<sub>276</sub>当り又はmg当りとして表示して、ラ

ッカーゼはpH6.5 において20又は50U に関する45単位の値それぞれを有した。LA CUアッセイはAbs<sub>276</sub>当り又はmg当り10又は22単位の値をもたらした。

r-MtL 活性のpHプロファイルは野生型のそれとかなり近く、6.5 の至適pHを有する。r-MtL について観察される20分の予備インキュベーション後に保持している完全活性にとっての上記温度値は約60℃である。精製 r-MtL はQ-Sepharose 溶出バッファーの中で-20℃で凍結して5週間保存しても活性を失わないことを示した。

Q-Sepharose で単離した発酵培養液から得られる r-MtL の2通りの形態を比較したとき、SDS-PAGE、自然PAGE、自然IEF、S-300 ゲル濾過、UV可視スペクトル、シリングアルダジン及びABTSに対する比活性、並びに脱ブロッキングしたN-末端配列決定尺度の観点において有意な差はなかった。同様に、Q-Sepharose での種々の溶出パターンは数種の異なるグリコシル化に由来する。

#### IV. 毛髪の色におけるマイセリオフトラ・ラッカーゼの利用

マイセリオフトラ・ラッカーゼの染色効果を様々な染料前駆体に基づき、そして更にはいく種かの改質剤と対比させた 0.1% p-フェニレンジアミンに基づいて試験した。

材料：

##### 染料前駆体：

0.1MのK-リン酸バッファー(pH7.0)中の0.1%のp-フェニレンジアミン

0.1MのK-リン酸バッファー(pH7.0)中の0.1%のアミノフェノール

##### 酵素：

組換えマイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼ16LACU/ml (

最終染色溶液中)。

##### 装置：

Datascolor Textflash 2000 (CIE-Lab)

### 毛髪の色の評価

巻き毛の定性的色調をDatascolor Textflash 2000で、CIE-Lab パラメーター  $L^*$  (「0」=黒、そして「100」=白) と  $a^*$  (「-」=緑、そして「+」=赤) を利用して決定する。

結果:

### 染色効果

ヨーロッパ人の金髪の巻き毛 (1 g) を酸化性毛髪染色についてマイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼを試験するために用いる。染料前駆体として  $p$ -フェニレンジアミン及び  $o$ -アミノフェノールを使用する。

### 毛髪染色

4mlの染料前駆体溶液をWhirley ミキサーで1mlのラッカーゼと混合し、巻き毛に塗布し、そして30°Cで60分保つ。その巻き毛を水道水で約3すすぎ、2本の指の間で押え、くしを通し、そして風乾する。

染色効果試験の結果を以下の表1及び2に示す。

表 1

$o$ -アミノフェノール	酵素	$L^*$	$a^*$
未処理の金髪	-	70.3	2.3
ラッカーゼ	+	57.7	15.3

$L^*$  : 0 = 黒、 100 = 白       $a^*$  : - = 緑、 + = 赤

表 2

$o$ -フェニレンジアミン	酵素	$L^*$	$a^*$
未処理の金髪	-	70.3	2.3
1.0mlのラッカーゼ	+	29.1	4.1

$L^*$  : 0 = 黒、 100 = 白       $a^*$  : - = 緑、 + = 赤

### 試験の結果

表1及び2から、マイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼが毛髪の酸化

的染色のために利用できることがわかる。

**生物材料の寄託**

以下の生物材料をブダペスト条約のもとで、1994年5月25日にAgricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604に寄託し、そして以下の受託番号が与えられている。

**寄託物**

pRaMB5含有のE. コリ JM101

**受託番号**

NRRL B-21261

## 配 列 表

## (1) 一般情報 :

## (i) 出願人 :

- (A) 名称 : Novo Nordisk Biotech, Inc.
- (B) 通り : 1445 Drew Avenue
- (C) 市 : Davis, California
- (D) 国 : United States of America
- (E) 郵便番号 : 95616-4880
- (F) 電話番号 : (916) 757-8100
- (G) ファックス番号 : (916) 758-0317

## (i) 出願人 :

- (A) 名称 : Novo Nordisk A/S
- (B) 通り : Novo Alle
- (C) 市 : Bagsv rd
- (D) 国 : Denmark
- (E) 郵便番号 : DK-2880
- (F) 電話番号 : +45 4444 8888
- (G) ファックス番号 : +45 4449 3256

- (ii) 発明の名称 : 精製されたマイセリオフトラ・ラッカーゼ及びそれをコードする核酸

## (iii) 配列の数 : 2

## (iv) 連絡先 :

- (A) 宛先 : Novo Nordisk of North America, Inc.
- (B) 通り : 405 Lexington Avenue, Suite 6400
- (C) 市及び州 : New York, New York
- (D) 国 : U. S. A.
- (E) 郵便番号 : 10174-6401

## (v) コンピューター読取フォーム :

- (A) 媒体タイプ : Floppy disk
- (B) コンピューター : IBM PC compatible
- (C) 作動システム : PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア : PatentIn Release #1.0, Version #1.25  
(EP0)

## (vi) 現出願人データー :

- (A) 出願番号 : 認定前
- (B) 出願日 : 1995年 5 月 31日
- (C) 分類 :

## (vii) 先の出願のデーター :

- (A) 出願番号 : US 08/253,781
- (B) 出願日 : 1994年 6 月 3 日

## (viii) 代理人/代理店情報 :

- (A) 名称 : Lowney, Karen A.
- (B) 登録番号 : 31,274
- (C) 参照/事件番号 : 4184.204-W0

## (ix) 通信情報 :

- (A) 電話番号 : 212 867 0123
- (B) ファックス番号 : 212 867 0298

## (2) SEQ ID NO : 1 についての情報 :

## (i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 3187塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖の数 : 二本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖

## (ii) 分子のタイプ : DNA(ゲノム)

(vi) 起源 :

(A) 生物 : マイセリオフトラ・サーモフィラ

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : イントロン

(B) 位置 : 833...917

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : イントロン

(B) 位置 : 996...1077

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : イントロン

(B) 位置 : 1090...1188

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : イントロン

(B) 位置 : 1261...1332

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : イントロン

(B) 位置 : 2305...2451

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : イントロン

(B) 位置 : 2521...2613

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : CDS

(B) 位置 : 連絡 (587..832, 918..995, 1078..1089,  
1189..1260, 1333..2304, 2452..2520,  
2614..3024)

(xi) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 1 :

GCTAGCTTCT TTGGTCACCG TCGTTTTCGC CGGCCCCCTC CCTCCTTCAA CCCCCTGAGT	60
AGTCGGCTAA GCGATCCTCA ATCTGGTCTT GTGAGCTCAC GTCCTCCAGC AGATGACAGT	120
TCATCGAGCG AGTGATCTCC ACCACCCAGA AGGGAGGGGG GATGCGCGCA TGCTCCAACA	180
TACCCCTGGTG TCGCTAGAGA CGTCGCGGCA TCAGCCTTTT CATCACACCG AGCAGGTCCA	240
CGGACCGGCT CCTTTACCCC CCGCGTCCTC CGGAGGATTG AGTCACGATA TTTCCGGGATG	300
TGGGAAGGGG GAGAGAAAGG AGGGGGGAGG GCGGAAACA TGTGGATAC GAGCTGCGCC	360
CCTTTTCCAA CATCGAGAAC AGGAAGTCGT TGGTGTGGC CGTAATGTCT ATAAAACGAG	420
GCTCCTTCTC GTCGTCGACT TGTCTCAGGT TCTCTCTCTC GTCCACACCA AGCCAGTCTT	480
GCCTGAGCCA CCTGAGCCAC CTTCAACTCA TCATCTTCAG TCAAGTCGTT CATGACATT	540
GTGTCTCTC TTTCTATCGAG TCGGCTTCCC GGCCTTCAC CACAAC ATG AAG TCC	595
Met Lys Ser	
1	
TTC ATC AGC GCC GCG ACG CTT TTG GTG GGC ATT CTC ACC CCT AGC GTT	643
Phe Ile Ser Ala Ala Thr Leu Leu Val Gly Ile Leu Thr Pro Ser Val	
5 10 15	
GCT GCT GCC CCT CCA TCC ACC CCT GAG CAG CGC GAC CTG CTC GTC CCG	691
Ala Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Glu Gln Arg Asp Leu Leu Val Pro	
20 25 30 35	
ATC ACC CAG AGG GAG CAG GCA GCC GTG AAG GCT CGC CAG CAG AGC TGC	739
Ile Thr Glu Arg Glu Glu Ala Ala Val Lys Ala Arg Gln Gln Ser Cys	
40 45 50	
AAC ACC CCC AGC AAC CGG GCG TGC TGG ACT GAC GGA TAC GAC ATC AAC	787
Asn Thr Pro Ser Asn Arg Ala Cys Trp Thr Asp Gly Tyr Asp Ile Asn	
55 60 65	
ACC GAC TAC GAA GTG GAC AGC CCG GAC ACG GGT GTT GTT CCG CCG	832
Thr Asp Tyr Glu Val Asp Ser Pro Asp Thr Gly Val Val Arg Pro	
70 75 80	
GTGAGTGCTC TCGTTAATTA CGCTTCGGCG AGTTGCGCAG ATATATTAAA TACTGCAAAC	892
CTAAGCAGGA CCTGACATGC GACAG TAC ACT CTG ACT CTC ACC GAA GTC GAC	944
Tyr Thr Leu Thr Leu Thr Glu Val Asp	
85 90	
AAC TGG ACC GGA CCT GAT GGC GTC GTC AAG GAG AAG GTC ATG CTG GTT	992
Asn Trp Thr Gly Pro Asp Gly Val Val Lys Glu Lys Val Met Leu Val	
95 100 105	
AAC GTACGGCACC CTTTTCTTG TCCTAGGATC TGGGTGATGT GCGTCGTTGC	1045
Asn	
CCCTGAGAGA CTGACCGAGC CTTTGGCTGC AG AAT AGT ATA ATC GTAATTAATT	1099
Asn Ser Ile Ile	
110	
ATACCGCCCT GCCTCCAGCA GCCCCAGCAG CTCGAGAAGG GTATCTCAAG TTAGTCAGGC	1159



CTGCTGACCT GACCGGGGCC AACCCATAG GGA CCA ACA ATC TTT GCG GAC TGG	1212
Gly Pro Thr Ile Phe Ala Asp Trp	115 120
GGC GAC ACG ATC CAG GTA ACG GTC ATC AAC AAC CTC GAG ACC AAC GGC	1260
Gly Asp Thr Ile Gln Val Thr Val Ile Asn Asn Leu Glu Thr Asn Gly	125 130 135
GTATGTCCTGC TGCTTGCTCT CTTGCTCTCC TCGTCCGCGA CTATAATAA TATCAACTCG	1320
TGTGGAAAAC AG ACG TCG ATC CAC TGG CAC GGA CTG CAC CAG AAG GGC	1368
Thr Ser Ile His Trp His Gly Leu His Gln Lys Gly	140 145
ACC AAC CTG CAC GAC GCG GCC AAC GGT ATC ACC GAG TGC CCG ATC CCC	1416
Thr Asn Leu His Asp Gly Ala Asn Gly Ile Thr Glu Cys Pro Ile Pro	150 155 160
CCC AAG CGA GCG AGG AAG GTG TAC CCG TTC AAG GCT CAG CAG TAC GGC	1464
Pro Lys Gly Gly Arg Lys Val Tyr Arg Phe Lys Ala Gln Gln Tyr Gly	165 170 175 180
ACG AGC TGG TAC CAC TCG CAC TTC TCG GCC CAG TAC GGC AAC GGC GTG	1512
Thr Ser Trp Tyr His Ser His Phe Ser Ala Gln Tyr Gly Asn Gly Val	185 190 195
GTC GGG GCC ATT CAG ATC AAC GGA CCG GCC TCG CTG CCG TAC GAC ACC	1560
Val Gly Ala Ile Gln Ile Asn Gly Pro Ala Ser Leu Pro Tyr Asp Thr	200 205 210
GAC CTG GGT GTG TTC CCC ATC AGC GAC TAC TAC TAC AGC TCG GCC GAC	1608
Asp Leu Gly Val Phe Pro Ile Ser Asp Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ala Asp	215 220 225
GAG CTG GTG GAA CTC ACC AAG AAC TCG GCG GCG CCC TTC AGC GAC AAC	1656
Glu Leu Val Glu Leu Thr Lys Asn Ser Gly Ala Pro Phe Ser Asp Asn	230 235 240 245
GTC CTG TTC AAC GCG ACG GCC AAG CAC CCG CAG ACG GCG GAG GCG GAG	1704
Val Leu Phe Asn Gly Thr Ala Lys His Pro Glu Thr Gly Glu Gly Glu	250 255 260
TAC GCC AAC GTG ACG CTC ACC CCG GGC CCG CCG CAC CCG CTG CCG CTG	1752
Tyr Ala Asn Val Thr Leu Thr Pro Gly Arg Arg His Arg Leu Arg Leu	265 270 275
ATC AAC ACG TCG GTC GAG AAC CAC TTC CAG GTC TCG CTC GTC AAC CAC	1800
Ile Asn Thr Ser Val Glu Asn His Phe Gln Val Ser Leu Val Asn His	280 285 290
ACC ATG TGC ATC ATC GCC GCC GAC ATG GTG CCC GTC AAC GCC ATG ACG	1848
Thr Met Cys Ile Ile Ala Ala Asp Met Val Pro Val Asn Ala Met Thr	295 300 305
GTC GAC AGC CTC TTC CTC GGC GTC GGC CAG CGT TAC GAT GTC GTC ATC	1896
Val Asp Ser Leu Phe Leu Gly Val Gly Gln Arg Tyr Asp Val Val Ile	310 315 320 325
GAA GCC AAC CGA ACG CCC GGG AAC TAC TGG TTT AAC GTC ACA TTT GGC	1944
Glu Ala Asn Arg Thr Pro Gly Asn Tyr Trp Phe Asn Val Thr Phe Gly	330 335 340

GGC GGC CTG CTC TGC GGC GGC TCC AGG AAT CCC TAC CCG GCC GCC ATC Gly Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Arg Asn Pro Tyr Pro Ala Ala Ile 345 350 355	1992
TTC CAC TAC GCC GGC GCC CCC GGC GGC CCG CCC ACG GAC GAG GGC AAG Phe His Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Gly Pro Pro Thr Asp Glu Gly Lys 360 365 370	2040
GCC CCG GTC GAC CAC AAC TGC CTG GAC CTC CCC AAC CTC AAG CCC GTC Ala Pro Val Asp His Asn Cys Leu Asp Leu Pro Asn Leu Lys Pro Val 375 380 385	2088
GTG GCC CGC GAC GTG CCC CTG AGC GGC TTC GCC AAG CCG GCC GAC AAC Val Ala Arg Asp Val Pro Leu Ser Gly Phe Ala Lys Arg Ala Asp Asn 390 395 400 405	2136
ACG CTC GAC GTC ACC CTC GAC ACC ACG GGC ACG CCC CTG TTC GTC TGG Thr Leu Asp Val Thr Leu Asp Thr Thr Gly Thr Pro Leu Phe Val Trp 410 415 420	2184
AAG GTC AAC GGC AGC GCC ATC AAC ATC GAC TGG GGG AGG GCC GTC GTC Lys Val Asn Gly Ser Ala Ile Asn Ile Asp Trp Gly Arg Ala Val Val 425 430 435	2232
GAC TAC GTC CTC ACG CAG AAC ACC AGC TTC CCA CCC GGG TAC AAC ATT Asp Tyr Val Leu Thr Gln Asn Thr Ser Phe Pro Pro Gly Tyr Asn Ile 440 445 450	2280
GTC GAG GTG AAC GGA GCT GAT CAG GTAAGAAAAA GGGGACCGCA GGGGTGCTGC Val Glu Val Asn Gly Ala Asp Gln 455 460	2334
TGCAAGTACA CCTTGCTCGC CCTCCTGTTT TTCCTTAATA ACTACCTCCC AACCTCCCC	2394
CCTAATTAAT TCACITTTAAA GGCAGATCAA GACTGACCGA GCCCCCTCTC TTTGCAG	2451
TGG TCG TAC TGG TTG ATC GAG AAC GAT CCC GGC GCA CCT TTC ACC CTA Trp Ser Tyr Trp Leu Ile Glu Asn Asp Pro Gly Ala Pro Phe Thr Leu 465 470 475	2499
CCG CAT CCG ATG CAC CTG CAC GTAAGTTGGA TACATATATA TATATATATA Pro His Pro Met His Leu His 480	2550
TACATTGCTT TCCTGGCTCG CTCCCTTAAA TAAATTTAAA TAACCAAAAA TAACAAAAAA	2610
AAG GGC CAC GAC TTT TAC GTG CTG GGC CGC TCG CCC GAC GAG TCG CCG Gly His Asp Phe Tyr Val Leu Gly Arg Ser Pro Asp Glu Ser Pro 485 490 495	2658
GCA TCC AAC GAG CCG CAC GTG TTC GAT CCG GCG CCG GAC GCG GGC CTG Ala Ser Asn Glu Arg His Val Phe Asp Pro Ala Arg Asp Ala Gly Leu 500 505 510 515	2706
CTG AGC GGG GCC AAC CCT GTG CCG CCG GAC GTG TCG ATG CTG CCG GCG Leu Ser Gly Ala Asn Pro Val Arg Arg Asp Val Ser Met Leu Pro Ala 520 525 530	2754
TTC GGG TGG GTG GTG CTG TCC TTC CCG GCC GAC AAC CCG GGC GCC TGG Phe Gly Trp Val Val Leu Ser Phe Arg Ala Asp Asn Pro Gly Ala Trp 535 540 545	2802

CTG TTC CAC TGC CAC ATC GCC TGG CAC GTC TCG GGC GGC CTG GGC GTC Leu Phe His Cys His Ile Ala Trp His Val Ser Gly Gly Leu Gly Val 550 555 560	2850
GTC TAC CTC GAG CGC GCC GAC GAC CTG CGC GGG GCC GTC TCG GAC GCC Val Tyr Leu Glu Arg Ala Asp Asp Leu Arg Gly Ala Val Ser Asp Ala 565 570 575	2898
GAC GCC GAC GAC CTC GAC CGC CTC TGC GCC GAC TGG CGC CGC TAC TGG Asp Ala Asp Asp Leu Asp Arg Leu Cys Ala Asp Trp Arg Arg Tyr Trp 580 585 590	2946
CCT ACC AAC CCC TAC CCC AAG TCC GAC TCG GGC CTC AAA CAC CGC TGG Pro Thr Asn Pro Tyr Pro Lys Ser Asp Ser Gly Leu Lys His Arg Trp 595 600 605	2994
GTC GAG GAG GGC GAG TGG CTG GTC AAG GCG TGACCGAAGG AGGAAAAAGG Val Glu Glu Gly Glu Trp Leu Val Lys Ala 610 615	3044
AAACAAAGAG GGGGGGGGGG GCTAGTTCCT ATTTTGTGCTT TTTTTTTTGG TTCTTGTCCT	3104
TGTGCTGGCG GTTCCCTGGT AAAGGAGAAG GGGGCCCCAA GTTCGAGTGG GTGTGTGATC	3164
GGGTAAATAT TATCAAGAGA TCT	3187

(2) SEQ ID NO : 2 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 620アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖

(ii) 分子のタイプ : タンパク質

(vi) 起源 :

(A) 生物 : マイセリオフトラ・サーモフィラ

(xi) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 2 :

Met Lys Ser Phe Ile Ser Ala Ala Thr Leu Leu Val Gly Ile Leu Thr 1 5 10 15
Pro Ser Val Ala Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Glu Gln Arg Asp Leu 20 25 30
Leu Val Pro Ile Thr Glu Arg Glu Glu Ala Ala Val Lys Ala Arg Gln 35 40 45

Gln Ser Cys Asn Thr Pro Ser Asn Arg Ala Cys Trp Thr Asp Gly Tyr  
 50 55 60  
 Asp Ile Asn Thr Asp Tyr Glu Val Asp Ser Pro Asp Thr Gly Val Val  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Tyr Thr Leu Thr Leu Thr Glu Val Asp Asn Trp Thr Gly Pro  
 85 90 95  
 Asp Gly Val Val Lys Glu Lys Val Met Leu Val Asn Asn Ser Ile Ile  
 100 105 110  
 Gly Pro Thr Ile Phe Ala Asp Trp Gly Asp Thr Ile Gln Val Thr Val  
 115 120 125  
 Ile Asn Asn Leu Glu Thr Asn Gly Thr Ser Ile His Trp His Gly Leu  
 130 135 140  
 His Gln Lys Gly Thr Asn Leu His Asp Gly Ala Asn Gly Ile Thr Glu  
 145 150 155 160  
 Cys Pro Ile Pro Pro Lys Gly Gly Arg Lys Val Tyr Arg Phe Lys Ala  
 165 170 175  
 Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Trp Tyr His Ser His Phe Ser Ala Gln Tyr  
 180 185 190  
 Gly Asn Gly Val Val Gly Ala Ile Gln Ile Asn Gly Pro Ala Ser Leu  
 195 200 205  
 Pro Tyr Asp Thr Asp Leu Gly Val Phe Pro Ile Ser Asp Tyr Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Ser Ser Ala Asp Glu Leu Val Glu Leu Thr Lys Asn Ser Gly Ala Pro  
 225 230 235 240  
 Phe Ser Asp Asn Val Leu Phe Asn Gly Thr Ala Lys His Pro Glu Thr  
 245 250 255  
 Gly Glu Gly Glu Tyr Ala Asn Val Thr Leu Thr Pro Gly Arg Arg His  
 260 265 270  
 Arg Leu Arg Leu Ile Asn Thr Ser Val Glu Asn His Phe Gln Val Ser  
 275 280 285  
 Leu Val Asn His Thr Met Cys Ile Ile Ala Ala Asp Met Val Pro Val  
 290 295 300  
 Asn Ala Met Thr Val Asp Ser Leu Phe Leu Gly Val Gly Gln Arg Tyr  
 305 310 315 320  
 Asp Val Val Ile Glu Ala Asn Arg Thr Pro Gly Asn Tyr Trp Phe Asn  
 325 330 335  
 Val Thr Phe Gly Gly Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Arg Asn Pro Tyr  
 340 345 350  
 Pro Ala Ala Ile Phe His Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Gly Pro Pro Thr  
 355 360 365  
 Asp Glu Gly Lys Ala Pro Val Asp His Asn Cys Leu Asp Leu Pro Asn  
 370 375 380

Leu Lys Pro Val Val Ala Arg Asp Val Pro Leu Ser Gly Phe Ala Lys  
 385 390 395 400  
 Arg Ala Asp Asn Thr Leu Asp Val Thr Leu Asp Thr Thr Gly Thr Pro  
 405 410 415  
 Leu Phe Val Trp Lys Val Asn Gly Ser Ala Ile Asn Ile Asp Trp Gly  
 420 425 430  
 Arg Ala Val Val Asp Tyr Val Leu Thr Gln Asn Thr Ser Phe Pro Pro  
 435 440 445  
 Gly Tyr Asn Ile Val Glu Val Asn Gly Ala Asp Gln Trp Ser Tyr Trp  
 450 455 460  
 Leu Ile Glu Asn Asp Pro Gly Ala Pro Phe Thr Leu Pro His Pro Met  
 465 470 475 480  
 His Leu His Gly His Asp Phe Tyr Val Leu Gly Arg Ser Pro Asp Glu  
 485 490 495  
 Ser Pro Ala Ser Asn Glu Arg His Val Phe Asp Pro Ala Arg Asp Ala  
 500 505 510  
 Gly Leu Leu Ser Gly Ala Asn Pro Val Arg Arg Asp Val Ser Met Leu  
 515 520 525  
 Pro Ala Phe Gly Trp Val Val Leu Ser Phe Arg Ala Asp Asn Pro Gly  
 530 535 540  
 Ala Trp Leu Phe His Cys His Ile Ala Trp His Val Ser Gly Gly Leu  
 545 550 555 560  
 Gly Val Val Tyr Leu Glu Arg Ala Asp Asp Leu Arg Gly Ala Val Ser  
 565 570 575  
 Asp Ala Asp Ala Asp Asp Leu Asp Arg Leu Cys Ala Asp Trp Arg Arg  
 580 585 590  
 Tyr Trp Pro Thr Asn Pro Tyr Pro Lys Ser Asp Ser Gly Leu Lys His  
 595 600 605  
 Arg Trp Val Glu Glu Gly Glu Trp Leu Val Lys Ala  
 610 615 620

【図 1】

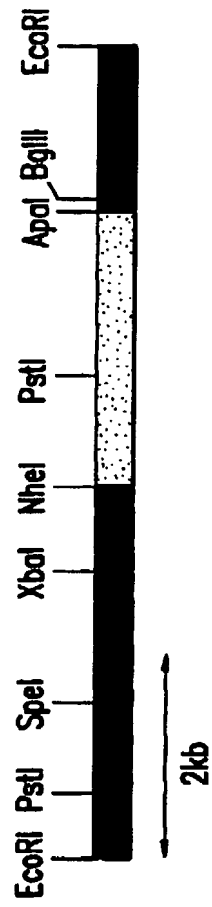


FIG.1

## 【图 2】

gctagcttcttgggcaccgleglltgcgcccgccectccctccttcaacccctgagtagtcggctaagcgatccleca 80  
 atctgggtcttggggtcacglectccagcagatgacagttcatcgagcgagtgatctccaccaccaggaagggaggggg 160  
 gatgcgcgcgatgtccaacalaccctgggtgcgtagagacglegggcatcagccttttcatcacaccgagcagcgleca 240  
 cggocccggtcctttcacccccgcglectccggaggatlgaglcacgatatttcgggatgtgggaagggggagagaaagg 320  
 aggggggggggggggaacalgttggatcagagctgcgccccttttccaacatcgagaacagggaagtcgttgggtgcggc 400  
 cglaatgtctgtaaacgaggctccttctcgctcgctgacttgcctcagggtctctctctcgctccacccaagccagctcl 480  
 gcctgagccacctgagccaccttcaactcatcatcttcagtcagtcglttcatlgacattgtgtctctcttctctcog 560  
 tcggcttcccggcccttcccccacATGAAGTCCTTCATCAGCGCCGACGCTTTGGTGGGCATTCTCACCCCTAGC 640  
 MetLysSerPheIleSerAlaAlaThrLeuLeuValGlyIleLeuThrProSer -30  
 GTTGCTGCTGCCCTCCATCCACCCCTGAGCAGCGGACCTGCTCGTCCCGATCAGGAGAGGGAGGAGGACCGTGAA 720  
 ValAlaAlaAlaProProSerThrProGluGlnArgAspLeuLeuValProIleThrGluArgGluGluAlaAlaVally -3  
 GGCTCGCCAGCAGAGCTGCAACACCCCGAGCAACCGGGCGTGTGGACTGACGGATAACGACATCAACACCGACTACGAAC 800  
 sAlaArgGlnGlnSerCysAsnThrProSerAsnArgAlaCysTrpThrAspGlyTyrAspIleAsnThrAspTyrGluV 25  
 TGGACAGCCCGACACGGGTGTTGTTCCGCCGgtgagtgctctcgcttaattacgcttcggcgagtgcgcgagatatatto 880  
 alAspSerProAspThrGlyValValArgPro 35  
 aatactgcaaacctaacgaggagctgacatgcgacogTACACTCTGACTCTCACCGAAGTCGACAACCTGGACCGGACCTG 960  
 TyrThrLeuThrLeuThrGluValAspAsnTrpThrGlyProA 50  
 ATGGCGTCGTCAGGAGAAGCTCATGCTGGTTAACAgtagcgaccccttttcttgcctcaggaatctgggtgatgtgcgt 1040  
 spGlyValValLysGluLysValMetLeuValAsnA 62  
 cgttgcctcagagagagctgaccgagccttggctgcagATAGTATAATCGgtaattanttataccgcccctgccicag 1120  
 snSerIleIleG 66  
 cagccccagcagctcgagaagggatctgaagtagtcaggcctgctgacctgaccggggccaaccaccatagGACCAA 1200  
 lyProT 68  
 CAATCTTTGGGACTGGGGGACACGATCCAGGTAACGGTCATCAACAACCTCGAGACCAACGGgtatgtctgctgcttg 1280  
 hrIlePheAlaAspTrpGlyAspThrIleGlnValThrValIleAsnAsnLeuGluThrAsnGI 89

FIG.2A

## 【图 2】

c t c t c t t g c t c t c t c g t c c g c g a c t a a t a a t a t c a a c t c g t g t g g a a a c a g	CACGTCGATCCACTGGCAACGACT	1360
	yThrSerIleHisTrpHisGlyLe	97
GCACCAGAAGGGACCAACCTGCACGACGGCGCAACGGTATCACCGAGTCCCCGATCCCCCAAGGGAGGGACGAACG		1440
uHisGlnLysGlyThrAsnLeuHisAspGlyAlaAsnGlyIleThrGluCysProIleProProLysGlyGlyArgLysV		124
TGTACCGGTTCAAGGCTCAGCAGTACGGGACGAGCTGGTACCACTCGCACTTCTCGGCCAGTACGGCAACGGCGTGGTC		1520
aITyrArgPheLysAlaGlnGlnTyrGlyThrSerTrpTyrHisSerHisPheSerAlaGlnTyrGlyAsnGlyValVal		150
GGGGCCATTGAGATCAACGGACGGCCTCGCTGCCGTACGACACCGACCTGGGTGTGTTCCCATCAGCGACTACTACTA		1600
GlyAlaIleGlnIleAsnGlyProAlaSerLeuProTyrAspThrAspLeuGlyValPheProIleSerAspTyrTyrTy		177
CAGCTCGGCGGACGAGCTGGTGAACCTACCAAGAACTCGGGGGGCGCCTTCAGCGACAACGTCCTGTTCAACGGCACGG		1680
rSerSerAlaAspGluLeuValGluLeuThrLysAsnSerGlyAlaProPheSerAspAsnValLeuPheAsnGlyThrA		204
CCAAGCACCCGGAGACGGGCGAGGGGCGAGTACGCCAACGTGACGCTACCCCGGGCGGGGCGACGGCTGCGCCTGATC		1760
IaLysHisProGluThrGlyGluGlyGluTyrAlaAsnValThrLeuThrproGlyArgArgHisArgLeuArgLeuIle		230
AACAGTCGGTCGAGAACCACTTCCAGGTCTCGTCTGTCACCAACCATGTGCATCATCGCCGCGACATGGTGCCCGT		1840
AsnThrSerValGluAsnHisPheGlnValSerLeuValAsnHisThrMetCysIleIleAlaAlaAspMetValProVa		257
CAACGCCATGACGGTCGACAGCCTCTTCTCGGGCTCGGCCAGCGTTACGATGTGTCATOGAAGCCAACCGAACGCCCG		1920
IAsnAlaMetThrValAspSerLeuPheLeuGlyValGlyGlnArgTyrAspValValIleGluAlaAsnArgThrProG		284
GGAAGTACTGTTTAAAGTCACATTGCGGGCGGCGCTGCTCTGCGGGCGCTCCAGGAATCCCTACCCGGCCGCCATCTTC		2000
IyAsnTyrTrpPheAsnValThrPheGlyGlyGlyLeuLeuCysGlyGlySerArgAsnProTyrProAlaAlaIlePhe		310
CACTACGCGGGCGCCCCCGGGCGGCCACGGACGAGGGCAAGGCCCGGTGACCCACAACGCTGCGACCTCCCCAA		2080
HisTyrAlaGlyAlaProGlyGlyProProThrAspGluGlyLysAlaProValAspHisAsnCysLeuAspLeuProAs		337
CCCTAAGCCCGTCTGTGGCCCGGACGTGCCCTGAGGGGCTTGCCCAAGCGGGCGGACAACAGCTCGACGTCACCCCTCG		2160
nLeuLysProValValAlaArgAspValProLeuSerGlyPheAlaLysArgAlaAspAsnThrLeuAspValThrLeuA		364
ACACCAAGGGCACGCCCCCTGTTCTGCTGGAAGGTCAACGGCAGCGCCATCAACATCGACTGGGGGAGGGCCGTCGCGAC		2240
spThrThrGlyThrProLeuPheValTrpLysValAsnGlySerAlaIleAsnIleAspTrpGlyArgAlaValValAsp		390
TACGTCCTACGCAGAACACAGCTTCCACCCGGGTACAACATTGTGAGGTGAACGGAGCTGATCAGgtaagaaaaag		2320
TyrValLeuThrGlnAsnThrSerPheProProGlyTyrAsnIleValGluValAsnGlyAlaAspGln		413
gggaccgcaggggtgclgclgcaaglacaccllgelegccctcclgttcttcccttaataactacctcccaaccctcccc		2400
claattoatttcactttaaagggcgatcaagactgaccgagcccccctcttcttgcagTGGTCGTACTGGTTGATGAGAAC		2480
	TrpSerTyrTrpLeuIleGluAsn	421

FIG.2B



GATCCGGCGCACCTTTACCCATCCGCATCCGATGCACCTGCACGtaagtTggatacatatatatatatatatacat	2560
AspProGlyAlaProPheThrLeuProHisProMetHisLeuHis	436
tgctttcctggctcgctcccttcaataaaattaaataaccataaaatlaacataaaataaagGGCCACGACTTTTACGTCTGG	2640
HlyHisAspPheTyrValLeuG	444
GCGCTCGCCGACGAGTCGCGGCATCCAACGAGCGGCACGTGTTTCGATCCGGCGCGGACGCGGCCTGCTGACGGG	2720
IyArgSerProAspGluSerProAlaSerAsnGluArgHisValPheAspProAlaArgAspAlaGlyLeuLeuSerGly	470
GCCAACCTGTGTCGGCGGGACGTGTCGATGTCGCGCGTTCGGGTGGGTGGTGTCTTCCTTCGGGCGGACAAACCGGG	2800
AlaAsnProValArgArgAspValSerMetLeuProAlaPheGlyTrpValValLeuSerPheArgAlaAspAsnProGlu	497
CGCTGGCTGTTCCACTGCCACATCGCTGGCAGTCTCGGCGCGCTGGGGTGTCTACCTCGAGCGCGCGACGACC	2880
yAlaTrpLeuPheHisCysHisIleAlaTrpHisValSerGlyGlyLeuGlyValValTyrLeuGluArgAlaAspAspL	524
TGCGCGGGGCGCTCTCGACGCCGACGCCGACGCTCGACCGCTCTGCGCGACTGGCGCGCTACTGGCTACCAAC	2960
euArgGlyAlaValSerAspAlaAspAlaAspAspLeuAspArgLeuCysAlaAspTrpArgArgTyrTrpProThrAsn	550
CCCTACCCCAAGTCGACTCGGGCTCAACACCGCTGGGTGAGGAGGGCGAGTGGCTGGTCAAGCGTgagcgaaggo	3040
ProTyrProLysSerAspSerGlyLeuLysHisArgTrpValGluGluGlyGluTrpLeuValLysAla***	573
ggataaagggaataaagaggggggggggggtagttcctatttttgcctttttttttgttcttgccttgtctggcgg	3120
ttccctggataaagggaagggggggcccaagttcgagtggtgtgtgacgggtaaatattatcaagagatct	3192

**FIG.2C**

【図3】

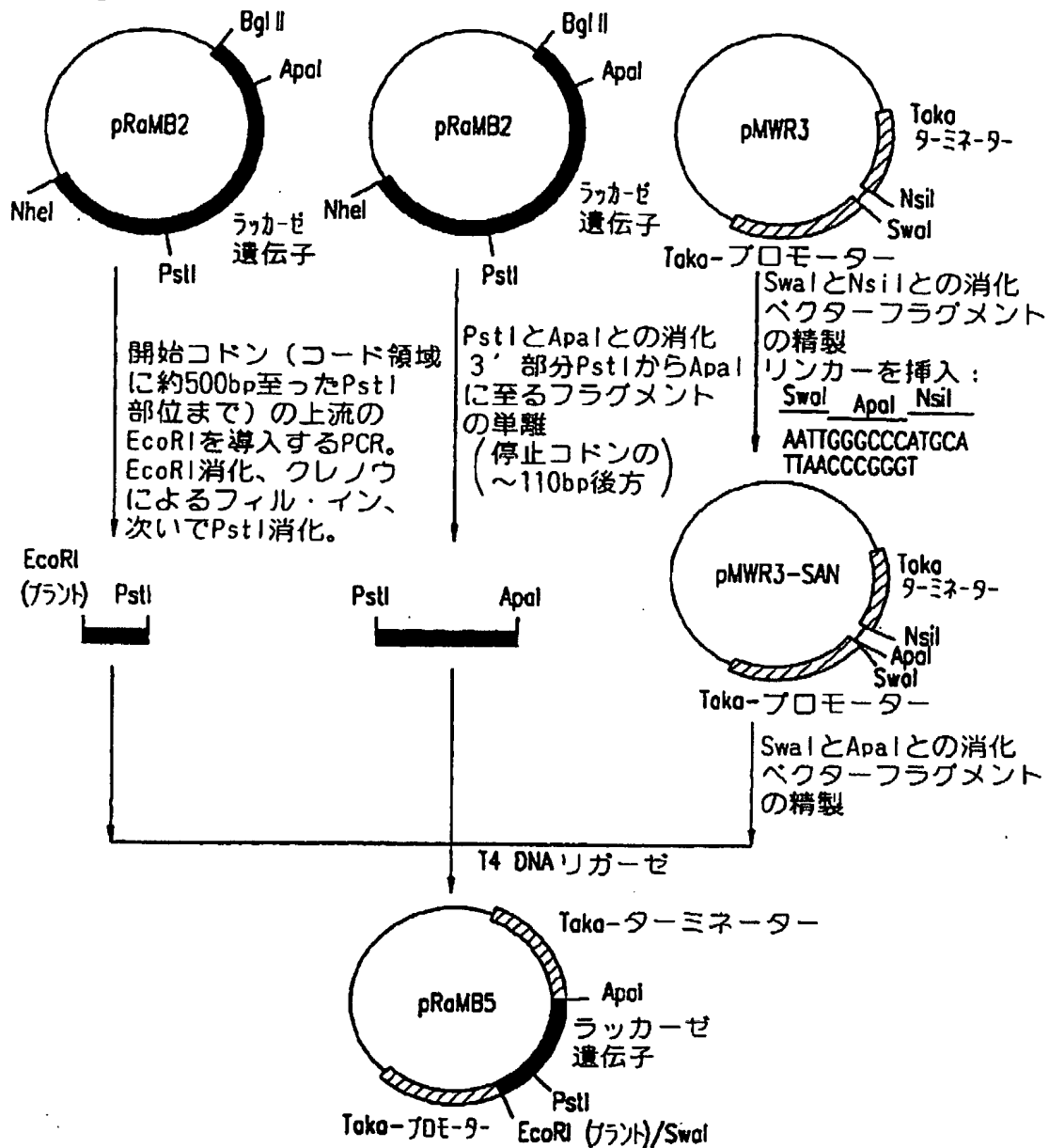


FIG.3

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年6月4日

【補正内容】

請求の範囲

1. SEQ ID NO. 2に記載のアミノ酸配列と約80%以上相同であるアミノ酸配列を有する実質的に純粋なマイセリオフトラ・ラッカーゼ。
2. SEQ ID NO. 2に記載のアミノ酸配列と約85%以上相同であるアミノ酸配列を有する請求項1記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼ。
3. SEQ ID NO. 2に記載のアミノ酸配列と約90%以上相同であるアミノ酸配列を有する請求項1記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼ。
4. SEQ ID NO. 2に記載のアミノ酸配列と約95%以上相同であるアミノ酸配列を有する請求項1記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼ。
5. マイセリオフトラ・サーモフィラ・ラッカーゼである請求項1記載のラッカーゼ。
6. SEQ ID NO. 2に記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼ。
7. 至適pHにおいてシリングアルダジンに対して30SOU/mg以上の比活性を有する請求項1記載のラッカーゼ。
8. 請求項1記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸を含んで成るDNA 構築体。
9. 請求項2記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸を含んで成るDNA 構築体。
10. 請求項3記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸を含んで成るDNA 構築体。
11. 請求項4記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする

核酸を含んで成るDNA 構築体。

12. 請求項5記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸を含んで成るDNA 構築体。

13. 請求項6記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸を含んで成るDNA構築体。

14. 請求項7記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼをコードする核酸を含んで成るDNA構築体。

15. 請求項8記載のDNA構築体を含んで成る組換えベクター。

16. 前記構築体がプロモーター配列に作用可能式に連結されている、請求項15記載のベクター。

17. 前記プロモーターが菌類又は酵母プロモーターである、請求項16記載のベクター。

18. 前記プロモーターがアスペルギルス・オリザのTAKAアミラーゼプロモーターである、請求項17記載のベクター。

19. 前記プロモーターがアスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・アワモリのグルコアミラーゼ (gluA) プロモーターである、請求項17記載のベクター。

20. 選択マーカーも含んで成る、請求項15記載のベクター。

21. 前記選択マーカーがamdS, pyrG, argB, hiaD, sC及びhygGより成る群から選ばれる、請求項20記載のベクター。

22. 前記選択マーカーがアスペルギルス・ニドゥランスもしくはアスペルギルス・オリザのamdSマーカー、又はアスペルギルス・ニドゥランス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリもしくはアスペルギルス・オリザのpyrGマーカーである、請求項20記載のベクター。

23. アスペルギルス・オリザのTAKAアミラーゼプロモーター及びアスペルギルス・ニドゥランス又はアスペルギルス・オリザのamdS

又はpyrGマーカーの双方を含んで成る、請求項20記載のベクター。

24. 請求項8記載の異種DNA構築体を含んで成る組換え宿主細胞。

25. 菌類細胞である請求項24記載の細胞。

26. アスペルギルス細胞である請求項24記載の細胞。

27. 前記構築体が宿主細胞のゲノムの中に組込まれている、請求項24記載の細胞。

28. 前記構築体がベクター上に含まれている、請求項24記載の細胞。
29. 前記核酸配列がSEQ ID NO. 2に示されているアミノ酸配列を有するラッカーゼをコードする、請求項24記載の細胞。
30. 前記ラッカーゼをコードする核酸配列を含むDNA 構築体を含んで成る組換宿主細胞を該ラッカーゼの発現を誘導する条件下で培養し、次いでその培養物からこの酵素を回収することを含んで成る、請求項1記載のラッカーゼを獲得するための方法。
31. 銅含有酵素をコードする配列を含むDNA 構築体を含んで成る組換宿主細胞を該酵素の発現を誘導する条件下で、約0.02mM以上の銅の存在下で培養することを含んで成る、請求項記載の活性組換ラッカーゼの収量を高める方法。
32. リグニン又はリグノスルフェート基質を溶液重合するための方法であって、前記基質を請求項1記載のラッカーゼと接触させることを含んで成る方法。
33. クラフトパルプにおけるin situ 脱重合のための方法であって、前記パルプを請求項1記載のラッカーゼと接触させることを含んで成る方法。
34. 染料又は染料前駆体を酸化するための方法であって、前記染料を請求項1記載のラッカーゼと接触させることを含んで成る方法。
35. 毛髪を染色するための方法であって、請求項1記載のラッカーゼを、少なくとも一種の改質剤の存在下又は非存在下で、少なくとも一種の染料前駆体と、その染料前駆体が染料へと酸化するのに足る時間及び条件下で接触させることを含んで成る、方法。
36. 前記染料前駆体がジアミン、アミノフェノール及びフェノールより成る群から選ばれる、請求項35記載の方法。
37. 前記改質剤が、使用する場合、メタージアミン、メターアミノフェノール又はポリフェノールである、請求項35記載の方法。
38. 前記染料前駆体がオルトもしくはパラジアミン又はアミノフェノールより成る群から選ばれる一次中間体である、請求項36記載の方法。
39. 一種より多くの染料前駆体を使用する、請求項35記載の方法。
40. 一種より多くの改質剤を使用する、請求項35記載の方法。

41. 一次中間体及び改質剤の双方を使用する、請求項35記載の方法。
42. 少なくとも一種の染料前駆体と組合された請求項1記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼを含んで成る染料組成物。
43. 少なくとも一種の一次中間体及び少なくとも一種の改質剤を更に含んで成る請求項42記載の染料組成物。
44. 請求項42記載の染料組成物を無酸素雰囲気下で含む容器。
45. 少なくとも一種の改質剤と組合された少なくとも一種の一次中間染料前駆体を更に含んで成る請求項44記載の容器。
46. フェノール系又はアニリン化合物を重合又は酸化するための方法であって、フェノール系又はアニリン化合物を請求項1記載のマイセリオフトラ・ラッカーゼと接触させることを含んで成る方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No. PCT/US 95/06815		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/53 C12N1/15 A61K7/13 A61K7/06 D21C5/00 //(C12N1/15,C12R1:66)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K D21C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  Relevant to claim No.	
P, O, X	ABSTRACTS OF PAPERS, vol.209, no.1-2, April 1995, ANAHEIM, CA BERKA R. ET AL. 'Cloning of laccases from the thermophilic fungi Myceliophthora thermophila and Scytalidium thermophilum and their heterologous expression in Aspergillus oryzae' see BIOT 196	1,2,6,7, 9,10, 18-20, 24-26
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.263, no.2, 1988, BALTIMORE, MD US pages 885 - 896 GERNANN U. ET AL. 'Characterization of two allelic forms of Neurospora crassa laccase' see page 885, right column	26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of making of the international search report	
29 August 1995	11.09.95	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2911 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Espan, J	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.  
PCT/US 95/06815

C(Communication) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 317 243 (KYOWA NEDEX CO. LTD.) 24 May 1989	
P,X	WO,A,95 01426 (NOVO NORDISK A/S) 12 January 1995 see page 19; claim 22	6,7,25, 26



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 95/06815

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0317243	24-05-89	JP-A- 1128797	22-05-89
		DE-D- 3851304	06-10-94
		DE-T- 3851304	26-01-95
		US-A- 5196312	23-03-93
<hr/>			
WO-A-9501426	12-01-95	AU-B- 6924594	24-01-95
<hr/>			

(51) Int. Cl. 6	識別記号	庁内整理番号	F I
//(C 1 2 N 1/15			
C 1 2 R 1:69)			
(C 1 2 N 9/02			
C 1 2 R 1:69)			

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, UZ, VN

(72) 発明者 ブラウン、スティーブン エイチ.  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 95616,  
デービス、ミウオック プレイス 3708

(72) 発明者 シュー、フェン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 95776、  
ウッドランド、カーメン バレー ドライ  
ブ 1534

(72)発明者 シェニデル、パール  
デンマーク国、デーコー—2750 ベレルー  
プ、リトフテン 43

(72)発明者 アースリン、ドーリット アニタ  
デンマーク国、デーコー—3500 ベルレー  
ゼ、ガートネールクローベン 69

(72)発明者 オクセンベール、カレン エム.  
デンマーク国、デーヨー—2920 カルロッ  
テンラント、スロットスバイ 76